

**Lichtmikroskopische Charakterisierung  
der intrazellulären Lokalisation der Kinase HIPK2  
anhand verschiedener Gen-Mutanten**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Horten, Daniela Klara**  
aus Wipperfürth

Gießen 2011

Aus dem Biochemischen Institut  
Fachbereich Medizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Gf. Direktor: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Disputation: 26.01.2012

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schreiben entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Daniela K. Horten

Gießen, 07.08.2011

Die in dieser Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet.  
Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann folglich nicht geschlossen werden, dass der  
entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Zellkern eukaryontischer Zellen .....	1
1.1.1 Ein Überblick über die Architektur und Funktionen des Zellkerns .....	1
1.1.2 Die nukleären Kompartimente, ihre mikroskopische Darstellung und Organisation ....	1
1.2 HIPK2 – Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 .....	2
1.2.1 Die HIPK-Familie .....	2
1.2.2 Die Lokalisation der HIPKs .....	3
1.2.3 Die Struktur von HIPK2 .....	4
1.2.4 Die Regulierung der HIPK2-Aktivität .....	4
1.2.5 Der Einfluss von HIPK2 auf den Zellzyklus und die Apoptose .....	8
1.2.6 Die möglichen Auswirkungen der intrazellulären Lokalisation von HIPKs auf die Regulierung der Gentranskription und die zelluläre Antwort auf Stress .....	11
1.2.7 HIPK2 und seine Interaktionspartner.....	13
1.3 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen.....	14
1.3.1 Der Zellzyklus – seine Funktion und die verschiedenen Phasen .....	14
1.3.2 Die Regulation des Zellzyklus .....	16
1.4 Ziele der Studie .....	17
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Chemikalien .....	18
2.2 Puffer und Lösungen.....	19
2.3 Nährmedien.....	21
2.3.1 Bakterielle Nährmedien .....	21
2.3.2 DMEM-Medium zur Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	21
2.4 Biologisches Material .....	21
2.4.1 Bakterienstamm .....	21
2.4.2 Eukaryontische Zellen.....	22
2.5 HIPK2-Konstrukte .....	22
2.6 Antikörper .....	23
2.6.1 Primärantikörper .....	23
2.6.2 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz .....	23
2.6.3 Sekundärantikörper für Westernblot .....	23

2.7	Molekularbiologische Methoden .....	23
2.7.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	23
2.7.2	Transformation von Bakterien .....	24
2.7.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	24
2.8	Zellbiologische Methoden .....	25
2.8.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	25
2.8.2	Transfektion von Zellen .....	26
2.8.3	Synchronisation.....	27
2.8.4	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	27
2.8.5	Herstellen von Zelllysaten .....	29
2.9	Immunfluoreszenz .....	29
2.9.1	Verschiedene Fixierungen .....	29
2.9.2	Antikörperfärbung.....	30
2.10	Statistische Auswertung der Experimente .....	31
2.11	Proteinbiochemische Methoden.....	31
2.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.11.2	Westernblot .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der endogenen HIPK2 .....	33
3.1.1	Bestimmung der optimalen Fixierungsmethode zur Darstellung der endogenen HIPK2 .....	33
3.1.2	Identifizierung der geeigneten HIPK2-Antikörper .....	34
3.1.3	Die geeignetste Kombination aus Fixierungsmethode und Antikörperfärbung.....	35
3.2	Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 nach Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife .....	35
3.2.1	Die auftretenden Phänotypen .....	35
3.2.2	Der mögliche Einfluss der Fixierungsmethode auf die Verteilung der Speckles.....	37
3.2.3	Die Phänotypen der einzelnen HIPK2-Mutanten.....	37
3.2.4	Beeinflussung der Größe, Form und Verteilung der Speckles durch Mutationen in der Aktivierungsschleife von HIPK2 .....	47
3.3	Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	48
3.3.1	Thymidin/Aphidicolin Synchronisation.....	48
3.3.2	Erfolgreiche Synchronisation der HeLa-Fucci-Zellen.....	51
3.3.3	Die Lokalisation der überexprimierten HIPK2 in eukaryontischen Zellen in Abhängigkeit vom Zellzyklus .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
4.1	Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der endogenen HIPK2 .....	58

4.2	Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 nach Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife .....	59
4.2.1	Die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen HIPK2-Konstrukte .....	59
4.3	Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A-549	humane Lungenkarzinomzelllinie
Abb.	Abbildung
AID	autoinhibitory domain
AML1	acute myeloid leukemia 1
AMP	Adenosinmonophosphat
APE	Alanin, Prolin, Glutamat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-xL	Basal cell lymphoma-extra large
brn3a	Brain-specific POU domain protein 3A
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CBP	CREB-binding protein
Cdk	cyclin-dependent kinase
Cdt1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
cm	Zentimeter
CMGC-Gruppe	beinhaltet CDK-, MAPK-, GSK-, CLK-Familien
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CtBP	carboxyl-terminal binding protein
DFG	Asparaginsäure, Phenylalanin, Glycin
DH-Box	DYRK homology box
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DYRK	dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	fetales Kälberserum
Fucci	fluorescent ubiquitination-based cell cycle indication
g	Gramm
Gem	Geminin
GFP	green fluorescent protein
GSK	Glycogen-Synthase-Kinase
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAUSP	herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
HIPK	homeodomain-interacting protein kinase
Hox	homeobox
HSP70	major heat shock and stress-induced protein
IgG	Immunglobulin G



IPF1/PDX	insulin promoter factor-1/pancreatic duodenal homeobox-1
JNK	c-Jun NH(2)-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria-Bertani broth
Lys	Lysin
M	molar
mAG	monomeric version of Azami Green
MAP	mitogen aktivierte Proteinkinase
MDM2	mouse double minute 2
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mKO2	monomeric version of Kusabira Orange 2
ml	Milliliter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MOZ	monocytic leukemia zinc finger protein
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NK	NK-Homeoproteine
Nkx-2.5	NK2 homeobox 5
NLS	Nuclear localization signals
NP40	Nonidet
p300	histone acetyltransferase p300
p38	Tumorprotein 38
p53	Tumorprotein 53
p73	Tumorprotein 73
PBS	phosphate buffered saline
Pc2	polycomb 2
PcG	polycomb group
PEST	Prolin, Glutamat, Serin, Threonin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PML	promyelocytic leukaemia
PML-NBs	Promyelocytic leukaemia nuclear bodies

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SFCs	Splicing-Faktor-Kompartimente
Siah	Seven in absentia homologue
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SP100	Speckled 100 kDa
Src	Schmidt-Ruppin viral oncogene homolog
SRS	speckle retention signal
SUMO-1	small ubiquitin-like modifier-1
TBS-T	Tris buffered saline with tween
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin
TGF	transforming growth factor
trkA	Neurotrophic tyrosine kinase, Rezeptor, Typ 1
TTF-1	thyroid transcription factor 1
U2OS	humane Osteosarkomzelllinie
UBC9	ubiquitin-like protein conjugating enzym 9
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
WSB-1	WD40-repeat/SOCS Box Protein-1

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Zellkern eukaryontischer Zellen

### 1.1.1 Ein Überblick über die Architektur und Funktionen des Zellkerns

Der Zellkern ist die erste intrazelluläre Struktur, die 1802 von Franz Bauer beschrieben wurde [1]. Der Zellkern eukaryontischer Zellen hat einen Durchmesser von ca. 10 µm und stellt die Schaltzentrale für alle Funktionen innerhalb einer Zelle dar. Er ist ein hoch dynamisches Zellorganell [2] und steuert die Zellfunktionen durch die Übermittlung der Informationen für die RNA- und DNA-Synthese. Seine vielseitigen Aufgaben reichen unter anderem von der Teilung der Zelle über den Erhalt der lebenswichtigen Stoffwechselprozesse bis hin zum programmierten Zelltod. Nur eine komplexe Architektur kann gewährleisten, dass diese Vielzahl an sehr unterschiedlichen Prozessen koordiniert werden kann [3, 4]. Zu diesem Zweck ist der Zellkern in Kompartimente unterteilt. Diese Aggregate sind gleichmäßig im Nukleus verteilt, was den Schluss zulässt, dass sie eine wichtige regulatorische Aufgabe in der Organisation des Zellkerns übernehmen [5]. Die Kerndomänen sind nicht von einer definierten Membran umgeben, sondern in einer sogenannten Kernmatrix verankert [6]. Auch wenn die Anordnung und Ausbildung der Kernkompartimente noch nicht ausreichend geklärt ist, existieren weitreichende Kenntnisse über einzelne von ihnen.

### 1.1.2 Die nukleären Kompartimente, ihre mikroskopische Darstellung und Organisation

Zu den nukleären Kompartimenten des Zellkerns gehören unter anderem die Kernhülle mit ihren nukleären Porenkomplexen, der Nukleolus [7], die *promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NBs) [8], die Splicing-Faktor-Kompartimente (SFCs) [9] und die Cajal Körperchen [10]. All diese Kerndomänen sind seit den 1980er Jahren durch Fluoreszenzmikroskopie darstellbar [11] und erscheinen als rundliche, voneinander abgetrennte Aggregate. Jedoch sind diese Kompartimente keinesfalls statische Objekte, sondern sie unterliegen einem konstanten Durchfluss [12], der sich auf bestimmte zelluläre Stimuli hin verändern kann. Eine unzureichende Organisation oder Instandhaltung dieser Kompartimente steht häufig in Verbindung mit Krankheiten [13]. Man hat herausgefunden, dass die Organisation zu solchen Kompartimenten in vielen Fällen mit der Funktion des entsprechenden Proteins in Zusammenhang steht. Ist dieses zum Beispiel beschädigt

und dadurch inaktiviert, so findet man es häufig nicht gruppiert in nukleären Domänen, sondern diffus verteilt im Kernplasma. So akkumuliert sich auch die in dieser Arbeit untersuchte *Homeodomain-interacting* Protein Kinase 2 (HIPK2) in ihrer natürlichen, aktiven Form im Zellkern zu HIPK-Domänen [14], die dann als sogenannte Speckles durch Anfärben fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Eine inaktive Punktmutante von HIPK2 bildet hingegen keine Speckles mehr [15]. Der Begriff Speckles hat sich durch ihr zerstreutes und formloses Erscheinungsbild ergeben. In eukaryontischen Zellen ist die Struktur und Funktionalität sehr stark vom transkriptionalen Stadium der Zelle abhängig [16]. Es gibt viele Hinweise dafür, dass Speckles als Speicher-, Versammlungs- oder Modifikationsort für Splicing-Faktoren dienen. Sie sind häufig in der Nähe von hoch aktiven Transkriptionsorten aufzufinden. Man weiß, dass Speckles neben prä-mRNA-Splicing-Faktoren viele davon unabhängige Proteine enthalten, und dass sie in ihrer Größe und Anzahl sehr stark variieren können [4]. Der Aufbau, die Funktion und die eventuell benötigten Stimuli zur Akkumulation der HIPK2-Speckles sind bislang unzureichend geklärt.

Alle Kompartimente des Zellkerns agieren in einer koordinierten Art und Weise untereinander durch Signalmechanismen. Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus in der Strukturierung subnuklearer Kompartimente [16]. Es gibt unzählige Arten, wie ein Protein posttranslational modifiziert werden kann, zum Beispiel durch Abspaltung bestimmter Reste, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung oder Sumoylierung. Diese Modifikationen haben enormen Einfluss auf die Struktur und Funktion der nukleären Untereinheiten. Zum Beispiel gibt es Kinasen, die erst phosphoryliert werden müssen, um aktiv zu sein, wie die *dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases* (DYRKs) [17]. Dann gibt es wiederum Tumorsuppressoren wie p53, welche erst eine Kaskade aus Phosphorylierung und Acetylierung durchlaufen müssen um vollständig aktiviert zu sein [18]. Um alle Interaktionen zwischen den einzelnen Kompartimenten des Zellkerns und ihre Bedeutung für den Organismus zu ergründen und zu verstehen sind weitere Forschungsanstrengungen erforderlich. So sind auch die genauen Mechanismen und Modifikationen zur Aktivierung und Akkumulation von HIPK2 bisher noch weitgehend unbekannt.

## 1.2 HIPK2 – Homeodomain-interacting Protein Kinase 2

### 1.2.1 Die HIPK-Familie

Die *Homeodomain-interacting* Protein Kinasen bilden eine Familie aus Korepressoren

für Homeoproteine. Zu ihnen gehören die Serin-Threonin-Kinasen HIPK1-3 und HIPK4. Die erste Entdeckung dieser neuen Familie gelang 1998 mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, durch das die HIPKs 1-3 identifiziert werden konnten [14]. Diese zeigen untereinander eine Übereinstimmung in den Aminosäuren ihrer Kinase-Domäne von über 85 % [19]. Kim et al. fanden damals bereits heraus, dass es sich bei dieser neuen Kinase-Familie um Korepressoren für Transkriptionsfaktoren handelt [14]. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von vor allem HIPK1 und -2, besteht eine erhöhte Möglichkeit, dass sie funktionell redundant sind. Knockout-Experimente zeigten, dass Mäuse, denen entweder HIPK1 oder HIPK2 fehlte, weitgehend normal entwickelt waren, während Mäuse, denen sowohl HIPK1 als auch -2 fehlten, zwischen E9,5 und E12,5 starben [19, 20]. Dass HIPK1 und -2 in ihrer Funktion jedoch nicht völlig identisch sind, konnte an HIPK2<sup>-/-</sup> Mäuse gezeigt werden. Bei ihnen kam es zu einem selektiven Verlust der dopaminergen Neuronen im Gehirn, so dass diese HIPK2<sup>-/-</sup> Mutanten eine Reihe an psychomotorischen Missbildungen aufwiesen [21]. Außerdem entwickelten HIPK2<sup>-/-</sup> Mäuse schneller Hauttumore als Wildtyp-Mäuse [22]. HIPK1 kann also in Abwesenheit von HIPK2 bestimmte Funktionen nicht übernehmen.

Erst 2002 stieß man auf das letzte Mitglied der Familie, HIPK4. Diese weist jedoch nur zu 50 % Identität in der Kinasedomäne mit HIPK1-3 auf. Die größte Ähnlichkeit hat HIPK4 zu HIPK1 [19]. Alle HIPKs sind in Wirbeltieren, wie Mäusen, Hunden, Kühen, Fröschen und dem Menschen konserviert [20]. Als erstes wurden sie in Mäusen identifiziert. HIPK2 wurde zusätzlich von Hamstern [23] und Menschen geklont [24, 25]. Desweiteren sind sie aber auch in wirbellosen Tieren, wie *Drosophila melanogaster* und *C. elegans*, konserviert. Die Mitglieder der HIPK-Familie scheinen eine große Rolle in der transkriptionalen Regulation, der Signaltransduktion und der Regulation der Proteinstabilität zu spielen [20].

### 1.2.2 Die Lokalisation der HIPKs

Die HIPKs 1-3 formieren sich im Nukleus zu Einheiten, den sogenannten HIPK-Speckles [14]. Diese HIPK-Körperchen haben eine variable Größe zwischen 0,1 und 1 µM. Sie befinden sich im gesamten Kern, zeigen jedoch eine Tendenz sich vermehrt in der Peripherie des Nukleus anzuhäufen [26]. Die Kinasefunktion der HIPKs ist relevant für ihre Lokalisierung in Speckles. So zeigt eine Punktmutante, deren Kinasefunktion inaktiviert ist, eine diffuse Verteilung im Kernplasma [15]. Neben den markanten nukleären Speckles tritt HIPK2 im Zytoplasma zusätzlich vereinzelt als Mikrospeckles in Erscheinung. Die Funktion dieser zytosolischen HIPK2 ist noch ungeklärt [20]. Im Gegensatz zu den anderen HIPKs befindet sich HIPK4 in ihrer aktiven Form stets überwiegend im Zytoplasma und zeigt nur ein schwaches Vorkommen im Nukleus [19].

### 1.2.3 Die Struktur von HIPK2

HIPK2 besteht aus multiplen funktionalen Domänen, zu denen die N-terminal gelegene Kinase-Domäne (KD) gehört. Im Zentrum des Proteins befindet sich eine Korepressordomäne, welche eine Interaktionsdomäne (ID) für Homeoproteine darstellt. Auf diese folgt eine PEST-Sequenz, welche reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist und der sich eine Sequenz mit starkem Vorkommen von Tyrosin und Histidin (YH) anschließt [27]. An Lys25 kann HIPK2 kovalent von *small ubiquitin-like modifier-1* (SUMO-1) modifiziert werden [28]. Ein *speckle retention signal* (SRS) wurde am C-Terminus beim Maus-HIPK2 an 860-967aa gefunden. Ohne dieses SRS ist eine Speckle-Bildung nicht möglich. Zusätzlich befinden sich zwei *nuclear localization signals* (NLS1, NLS2) in HIPK2, die für ihre Lokalisation im Kern verantwortlich sind [L. de la Vega (im Druck)]. Der SRS folgend schließt sich eine *autoinhibitory domain* (AID) und eine Region reich an Serin, Glutamin und Alanin (SQA) an. Das Gen für die menschliche HIPK2 befindet sich auf dem Chromosom 7q32-q34. Bei Mäusen befindet sich HIPK2 auf dem Chromosom 6B, welches homolog zum menschlichen Chromosom 7 ist [24]. Eine schematische Darstellung von HIPK2 ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

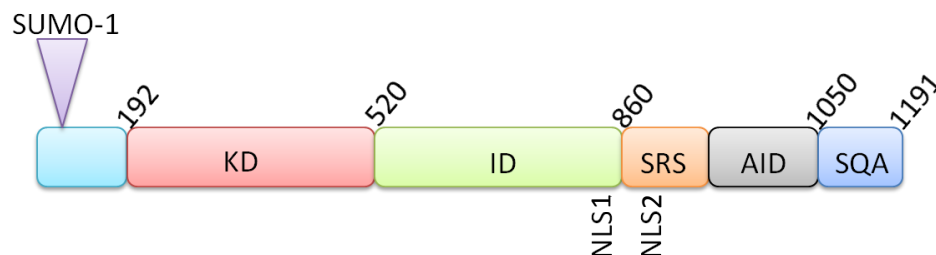


Abb. 1.1: Schematische Struktur von HIPK2. Die einzelnen Domänen von HIPK2 sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Zusätzlich ist deren Position innerhalb der Aminosäuresequenz angegeben. KD=Kinase-Domäne, ID=Interaktionsdomäne, SRS=*speckle retention signal*, AID=*autoinhibitory domain*, SQA=Ser-, Gln-, Ala-Wiederholungen, SUMO-1=*small ubiquitin-like modifier-1*, NLS=*nuclear localization signal*

### 1.2.4 Die Regulierung der HIPK2-Aktivität

#### 1.2.4.1 Posttranslationale Modifizierung - Sumoylierung von HIPK2

Posttranslationale Modifizierung kann auf verschiedene Art und Weise geschehen und ist ein Mechanismus, der eine wichtige Rolle in der Regulation der zellulären Proteinfunktion spielt [27]. Durch diese Modifikationen können unter anderem Kinasen aktiviert oder deaktiviert werden.

Im Falle von HIPK2 sind die Sumoylierung [27] und die Ubiquitinierung [29-31] bekannt. HIPK2 wiederum phosphoryliert viele ihrer Interaktionsproteine um diese zu regulieren [32-34].

Kim et al. haben gezeigt, dass SUMO-1 kovalent an Lysin 25 von HIPK2 anheften kann [27]. Lysin 25 ist ein SUMO-modifizierungs-Motiv, dass sowohl in menschlichen HIPK-Proteinen, als auch in denen von Mäusen konserviert ist [35]. Während einige Proteine von mehreren SUMO-Isoformen modifiziert werden können, ist die Sumoylierung bei HIPK2 nur durch SUMO-1 möglich. SUMO-2 und -3 können HIPK2 nicht modifizieren [36]. Mittlerweile ist bekannt, dass HIPK2 an multiplen Stellen sumoyliert werden kann und dass dies ihre Interaktion mit Partnerproteinen beeinflusst [37]. So verhindert die Sumoylierung von HIPK2 deren vermittelte Aktivierung des JNK-Pfads (*c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway*) sowie ihre p53-unabhängige antiproliferative Funktion [35]. Auch die Stabilität von HIPK2 und ihre Versammlung in PML-NBs unterliegen einem Einfluss durch Sumoylierung [28, 38].

#### **1.2.4.2 Die Regulierung der HIPK2-Proteinmenge durch das Ubiquitin-Proteasomen-System**

Die vorhandene Proteinmenge von HIPK2 in der Zelle wird streng durch das Ubiquitin-Proteasomen-System überwacht. Die Ubiquitin E3 Ligase MDM2 (*mouse double minute 2*) sorgt durch die Ubiquitinierung von HIPK2 für deren Degradation. MDM2 wird durch p53 aktiviert, welches so seine eigene Phosphorylierung durch HIPK2 am Serin 46 unterdrückt und dadurch seinen eigenen proapoptotischen Aktivator ausschaltet. Dies geschieht als Folge von leichten, reparablen DNA-Schäden, auf die p53 mit einem Arrest des Zellzyklus reagiert und verhindert, dass eine Überreaktion der Apoptose-Kaskade erfolgt [39].

Eine weitere Ubiquitin E3 Ligase, die die Stabilität von HIPK2 kontrolliert, ist WSB-1. WSB-1 ist ein WD40-repeat/SOCS Box Protein, welches unter normalen Bedingungen in der Zelle HIPK2 ubiquitiniert und somit deren Menge in der Zelle auf einem niedrigen Level hält. Kommt es jedoch zu einem irreparablen DNA-Schaden, wird dieser Prozess verhindert, so dass die intrazelluläre HIPK2-Menge ansteigt. Daraus resultiert als Antwort auf den DNA-Schaden eine erhöhte Apoptoserate [29].

In gleicher Weise verhält sich die Interaktion zwischen HIPK2 und der Ubiquitin E3 Ligase Siah-1 (*Seven in absentia homologue-1*). Auch hier führt die Ubiquitinierung von HIPK2 durch Siah-1 zur Inaktivierung von HIPK2. Unter normalen zellulären Bedingungen bilden Siah-1 und HIPK2 Komplexe, die als Antwort auf starke DNA-Schäden aufgelöst werden, so dass die HIPK2-Menge ansteigt und die Apoptose eingeleitet wird [30, 40].

Siah-2 (*Seven in absentia homologue-2*) hingegen ist ein Interaktionspartner von HIPK2, der unter hypoxischen Bedingungen verstärkt mit HIPK2 interagiert und eine Polyubiquitinierung hervorruft. Unter normoxischen Bedingungen befinden sich nur wenige HIPK2s an Siah-2 gebunden. Da HIPK2 eine wichtige Rolle in der Unterdrückung der Genexpression spielt, kann durch ihre Hemmung, ausgelöst durch eine Hypoxie, sicher gestellt werden, dass eine gewisse Menge an Hypoxie-induzierten Genen produziert werden kann, so dass die Zelle in der Lage ist, diesem Zustand möglichst schnell entgegenzuwirken [41].

#### 1.2.4.3 Die Entfernung der AID durch Caspasen

Die Aktivität von HIPK2 kann auch durch Caspasen reguliert werden. Diese spalten als Antwort auf DNA-Schäden in der Aminosäuresequenz von HIPK2 die Asparaginsäuren an Position 916 und 977, wodurch HIPK2 seine *autoinhibitory domain* (AID) verliert [42]. Die somit am C-Terminus verkürzte HIPK2 weist eine verstärkte Aktivität auf, wodurch die Phosphorylierungsrate des Serins 46 durch p53 gesteigert wird [43]. Gresko et al. haben gezeigt, dass eine frühe Einleitung der p53-Antwort auf DNA-Schäden einen *feed-forward loop* auslöst, durch den p53 die Aktivität von HIPK2 steigert, wodurch diese wiederum eine erhöhte Phosphorylierungsrate von p53 aufweist. Somit kann zu Beginn der Apoptose die entsprechende Kaskade schneller anlaufen. Ist der apoptotische Prozess angelaufen, verringert sich die HIPK2-Menge wieder bis hin zum Ende der Apoptose. Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass nur zu Beginn der Apoptose in sehr kurzer Zeit eine große Menge an HIPK2 vorhanden ist und die Kaskade schnell anlaufen kann [42].

#### 1.2.4.4 Die Aktivierungsschleife der DYRK-Kinasen und ihre Aktivierung durch cis-Autophosphorylierung

HIPK2 gehört zu der Proteinkinase-Familie DYRK [24], welche wiederum zu der CMGC-Gruppe der Kinasen gehört [17]. Zu den DYRKs zählen mindestens sieben in Säugetieren vorkommende Isoformen [44]. Alle Mitglieder der DYRK-Familie haben eine konservierte Kinase-Domäne und eine daran angrenzende N-terminale DH-Box gemeinsam [17]. Das Abgleichen der Kinase-Domäne von HIPK2 und verschiedenen Mitgliedern der DYRK-Familie hat gezeigt, dass mehrere evolutionär konservierte Regionen bestehen, die untereinander sehr homolog sind. Somit ergab sich eine Unterteilung der DYRK-Kinasen und die Festlegung einer neuen Untergruppe, der unter anderem auch HIPK2 angehört. Des Weiteren beinhaltet die Aminosäuresequenz von HIPK2



ein konserviertes Lysin an Position 221, das bei allen DYRK-Kinasen vorhanden ist und für die ATP-Bindung der Kinasen wichtig ist [24].

DYRK steht für *dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated protein kinases*. Dieser Name beschreibt bereits die Art ihrer Aktivierung. DYRKs besitzen eine Aktivierungsschleife, in der sie ein Tyrosin autophosphorylieren, wodurch die Kinase in den aktiven Zustand überführt wird [17]. Die Phosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife ist die häufigste Methode um die Kinaseaktivität zu regulieren [45]. Des Weiteren spielt die Aktivierungsschleife aber auch eine einflussreiche Rolle in der Interaktion zwischen Proteinen, was sowohl Einfluss auf die Lokalisation und die Regulierung der Kinase haben kann, als auch die Interaktion mit ihren Bindungspartnern beeinflusst [46]. Die Aktivierungsschleife ist ein kurzes Peptid mit variabler Länge von ca. 20 bis 30 Aminosäureresten. Sie wird von zwei konservierten Regionen eingerahmt, die als N- und C-terminale Ankerregionen bezeichnet werden. Als Ganzes kann die Aktivierungsschleife mit ihren beiden Ankerregionen als Aktivierungssegment identifiziert werden, da sie zwischen dem DFG- und APE-Motiv liegt [47]. Vom N- zum C-Terminus liegt als erstes die kinase-konservierte DFG-Sequenz, die sich innerhalb der Magnesium-Bindungsschleife befindet, dann folgt die Aktivierungsschleife und in C-terminaler Richtung schließt sich die APE-Sequenz an, die in die P+1-Schleife integriert ist [45] (Abb. 1.2).

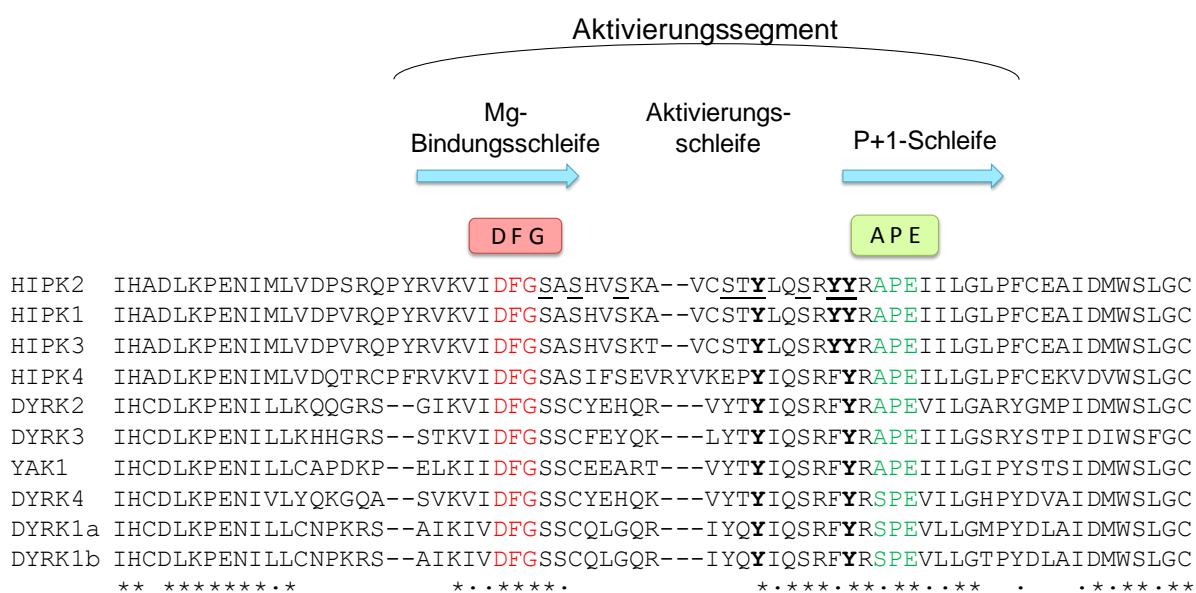


Abb. 1.2: Der Aufbau der Aktivierungsschleife von HIPK2 und verwandten Kinasen. Die Ankerregionen sind in rot und grün dargestellt. Die phosphorylierten Tyrosine sind fett gedruckt und weitere mögliche Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen. Der Grad der Homologie zwischen den einzelnen Sequenzen ist in der untersten Zeile angegeben. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Es sind drei verschiedene Wege bekannt, die zur Phosphorylierung der Aktivierungsschleife führen können (Abb.1.3): (I) Die Aktivierung im Zuge einer Signalkaskade durch eine bereits im vorangegangenen Schritt aktivierte Kinase. Das klassische Beispiel für diesen Weg ist die MAP-Kinase-Aktivierung. (II) Durch eine Trans-Autophosphorylierung, in der eine aktive Kinase eine noch inaktive Kinase autophosphoryliert, wie zum Beispiel bei Src [48]. (III) Die Cis-Autophosphorylierung, die während der Bildung einer Kinase am Ribosom vollzogen wird oder durch einen Bindungspartner erfolgen kann. Diese Art der Aktivierung ist bisher nur von CMGC-Kinasen wie DYRK, p38 und GSK-3 bekannt [47]. Alle DYRKs autophosphorylieren ein Tyrosin in ihrer Aktivierungsschleife, während sie bei ihren Bindungspartnern die Phosphorylierung nur an Serinen und Threoninen durchführen [49, 50]. Da HIPK2 ebenfalls eine solche Aktivierungsschleife in seiner Aminosäuresequenz aufweist und Mitglied der DYRK-Familie ist, liegt es nahe, hier den gleichen oder zumindest einen ähnlichen Weg zur Aktivierung der Kinase zu vermuten. Eine Bestätigung dieser Vermutung ist bisher noch nicht erfolgt und bedarf weiterer Forschungsprojekte. Ein Schritt in diese Richtung war eine der Zielsetzungen der nachfolgend beschriebenen Studie.

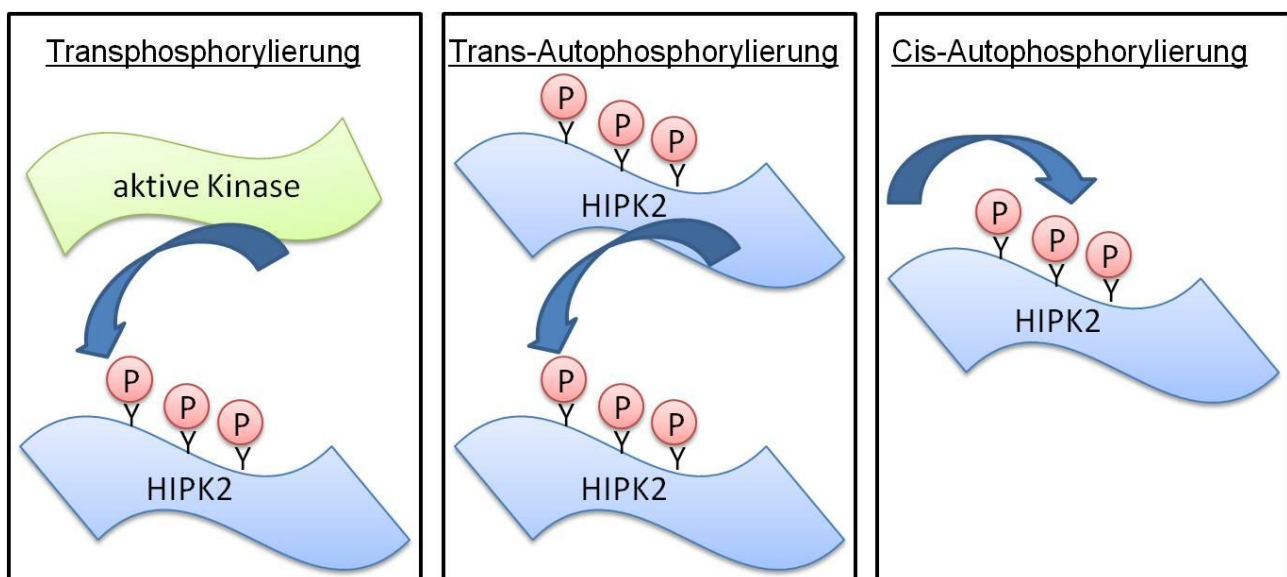


Abb. 1.3: Drei mögliche Wege zur Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von HIPK2.

### 1.2.5 Der Einfluss von HIPK2 auf den Zellzyklus und die Apoptose

HIPK2 beteiligt sich an der Regulierung des Zellwachstums und der Apoptose. Wird es aus Zellen entfernt, sinkt die Apoptoserate, während ein verstärktes Vorkommen an HIPK2 entsprechend häufiger Apoptose hervorruft [20].

### 1.2.5.1 HIPK2 als Transkriptionsrepressor

HIPK2 wurde 1998 durch seine Bindung an die NK-Homeoproteine entdeckt. Die NK-Homeobox-Gene sind besonders wichtig während der Embryogenese und der Organentwicklung. Durch HIPK2 wird die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NK-3 gefördert, was zu einer Potenzierung seiner Repressor-Aktivität führt. Also kann HIPK2 als Korepressor von NK-3 fungieren. Des Weiteren kann HIPK2 aber auch mit anderen Mitgliedern der NK-Homeoprotein-Familie interagieren, wie zum Beispiel dem NK-1 und -3 der *Drosophila* und dem Nkx-2.5, HoxD4 und HoxC4 der Maus [14]. Die Bedeutung dieser Interaktionen ist noch unbekannt. Darüber hinaus interagiert HIPK2 mit TTF-1, welcher bei der Entwicklung der Lunge, der Schilddrüse und des Vorderhirns eine Rolle spielt. Jedoch zeigt diese Interaktion keinen Effekt bezogen auf die transkriptionale Aktivität von TTF-1 [51]. Zusätzlich scheint HIPK2 Teil eines Korepressor-Komplexes zu sein, dem auch Groucho, mSin3A und eine Histon-Deacetylase angehören [52]. Auch die Interaktion mit dem transkriptionalen Korepressor CtBP weist auf eine Aktivität HIPK2s als Transkriptionsrepressor hin. CtBP steht für *carboxyl-terminal binding protein* und hat eine antiapoptotische Funktion. HIPK2 phosphoryliert CtBP am Serin 422, woraufhin dieses proteasomal abgebaut wird. Somit fördert HIPK2 die Apoptose [53]. Auch die Gene *brn3a*, *trkA* und *bcl-xL* weisen eine antiapoptotische Aktivität auf. HIPK2 reguliert die *brn3a*-vermittelte Genexpression dieser drei Gene herunter und begünstigt dadurch ebenfalls die Apoptose. Dieses Phänomen wurde getestet, indem Wiggins et al. in kultivierten sensorischen Neuronen HIPK2 überexprimiert haben, so dass es zum Abbau der antiapoptotischen Proteine kam. Das Gleiche wurde ein weiteres Mal an sich entwickelnden sensorischen Ganglien durchgeführt und es kam ebenfalls zu einer erhöhten Apoptoserate. HIPK2-defiziente Ganglien zeigten eine gesteigerte Expression der oben genannten antiapoptotischen Proteine, wodurch es zu einer erhöhten Anzahl an Neuronen in den betroffenen Ganglien kam. Somit resultiert in Abwesenheit von HIPK2 eine verringerte Apoptoserate [54]. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass HIPK2 ein sehr potenter Transkriptionsrepressor ist, deren vermehrtes Auftreten die Apoptose begünstigt und bei deren verminderter Produktion die Apoptoserate drastisch sinkt.

### 1.2.5.2 Mechanismus der HIPK2-vermittelten Regulierung von Zellzyklus und Apoptose

DNA-Schäden lösen im Körper verschiedene Signalkaskaden aus. Eine davon setzt HIPK2 durch die Aktivierung von p53 in Gang. Diese Aktivierung durch HIPK2 führt nicht zur Hemmung des Zellzyklus, sondern bewirkt die Apoptose der Zelle [32, 55-57]. Die HIPK2-Konzentrationen in Tumorzellen der Brust und der Schilddrüse sind stark reduziert. Aufgrund

dieser Ergebnisse beschreiben Pierantoni et al. HIPK2 als einen möglichen Tumorsuppressor [55]. Auch Hofmann et al. und D'Orazi et al. kommen 2002 zu ähnlichen Ergebnissen. Sie finden heraus, dass HIPK2 als Antwort auf DNA-Schäden p53 am Serin 46 phosphoryliert, wodurch dessen apoptotische Aktivität herbeigeführt wird [32, 56]. Zusätzlich bindet HIPK2 auch an p73, einem Mitglied der p53-Familie [58]. Als Folge der Phosphorylierung von p53 am Serin 46 durch HIPK2 kann die CBP-vermittelte (*CREB-binding protein*) Acetylierung und die HAUSP-abhängige (*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*) Deubiquitinierung von p53 stattfinden. Die Acetylierung von p53 am Lysin 373 und 382 durch CBP führt zu einem Anstieg der p53-abhängigen Genexpression, wodurch die Apoptose begünstigt und die Zellalterung beschleunigt wird [32, 59]. HIPK2 gibt mit ihrer p53-Phosphorylierung den ersten Anstoß für eine Signalkaskade, die zur Einleitung der Apoptose führt (Abb.1.4). Alle oben beschriebenen Prozesse finden in *promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NBs) statt [15]. PML rekrutiert HIPK2 und p53 in PML-NBs [32, 60], wo sie dann untereinander und mit CBP und HAUSP interagieren können. Zusätzlich schützt HIPK2 p53 vor dem Export aus dem Kern, indem sie die Menge an Mdm2-Protein verringert. Das Mdm2-Protein ubiquitiniert p53 und vermittelt seine Auslagerung aus dem Kern [61, 62]. HIPK2 fördert als proapoptotischer Aktivator [63] also das Potential einer Zelle den programmierten Zelltod zu erleiden, indem sie die Anwesenheit und Funktionalität von p53 sichert und dieses auf gewisse Stimuli hin aktiviert.

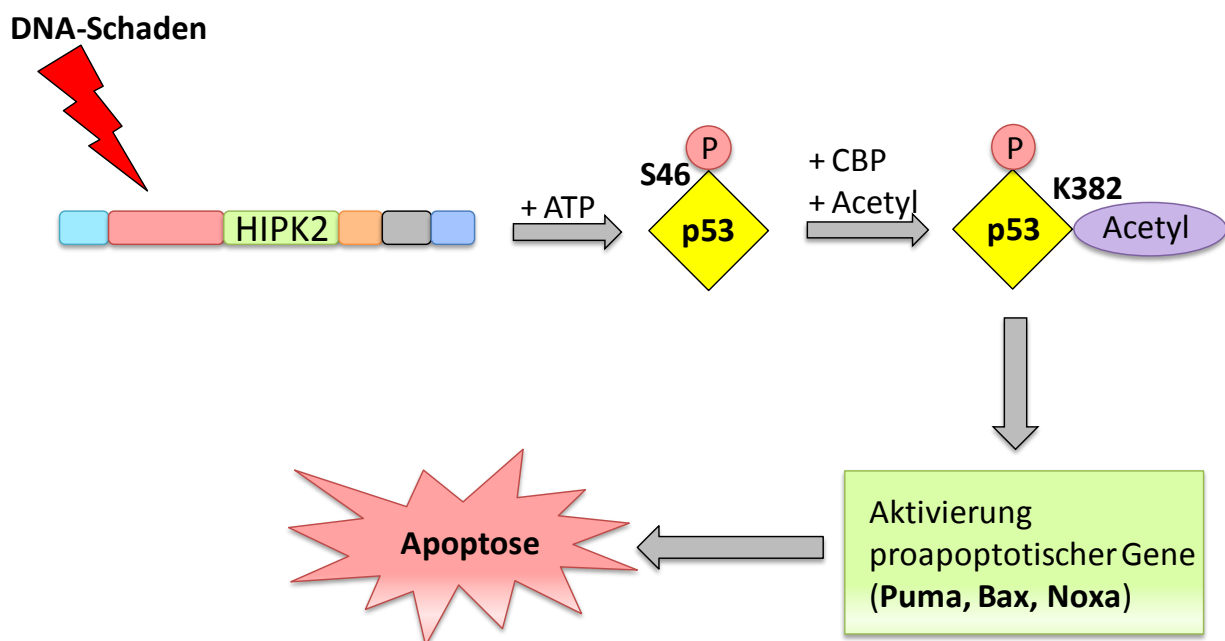


Abb. 1.4: HIPK2 phosphoryliert p53 an Ser 46 als Antwort auf DNA-Schäden. Hierdurch kommt es zur CBP-vermittelten Acetylierung von p53 und zum Anstieg der proapoptotischen Genexpression, woraus eine

gesteigert Apoptoserate resultiert. ATP=Adenosin-Triphosphat, P=Phosphat, Puma=*p53-upregulated modulator of apoptosis*, Bax=*Bcl2-associated X protein*, Noxa=*phorbol-12myristate-13-acetate-induced protein 1*

HIPK2 kann auch unabhängig von p53 das Zellwachstum hemmen und die Apoptose einleiten. Hofmann et al. zeigten, dass HIPK2 bei der *transforming growth factor* (TGF)-induzierten Aktivierung der *c-Jun NH(2)-terminal kinase* (JNK) beteiligt ist. Diese Signalkaskade wird durch die mitogen-aktivierten Proteinkinasen MKK4 und MKK7 vermittelt, welche dann zur Aktivierung der JNK führen. Diese Versuche sind alle in menschlichen Lebertumorzellen durchgeführt worden, denen der Tumorsuppressor p53 fehlt [64]. Somit zeigten Hofmann et al. die Unabhängigkeit der HIPK2-induzierten Apoptose von p53.

### 1.2.5.3 HIPK2 sichert das Überleben von dopaminergen Neuronen

Alle unter 1.3.7 aufgeführten Interaktionen von HIPK2 in der Zelle führen zur Hemmung des Zellzyklus bis hin zur Apoptose. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass HIPK2 nicht nur als Apoptose-einleitende Kinase aktiv ist, sondern auch das Überleben bestimmter Zellen sichern kann. Untersucht wurde diese Eigenschaft von Zhang et al. an dopaminergen Neuronen des Mesencephalons von Mäusen. HIPK2 fungiert hier als Kofaktor für das TGF $\beta$ -vermittelte Überleben dieser Neurone. Bei HIPK2<sup>-/-</sup> Mutanten kam es zu einem selektiven Verlust der Neurone durch eine erhöhte Apoptoserate. Als Folge litten die betroffenen Mäuse an einer Reihe psychomotorischer Anomalitäten. In dopaminergen Neuronen des Mesencephalons von Mäusen ist die Anwesenheit von HIPK2 also erforderlich, um das Überleben dieser Neurone zu sichern [21].

### 1.2.6 Die möglichen Auswirkungen der intrazellulären Lokalisation von HIPKs auf die Regulierung der Gentranskription und die zelluläre Antwort auf Stress

Die HIPKs (HIPK1-3) erfüllen eine Vielzahl an sehr unterschiedlichen Aufgaben. Eine große Rolle für diese Vielfalt scheint ihre komplex strukturierte Lokalisation in subnuklearen Domänen zu spielen [26]. Bereits mehrfach wurden die überexprimierten HIPKs fluoreszenzmikroskopisch durch verschiedene Epitop-Tags, wie GFP, Flag, HA oder Myc in vom Menschen oder von Mäusen stammenden Zellen sichtbar gemacht [14, 65-67] so dass man ihre Lokalisationen innerhalb der Zelle dokumentieren konnte. Bisher ist weder bekannt, was für eine Funktion die HIPK-Domänen haben, noch ob in ihnen die HIPK2-Aktivität hoch oder niedrig ist.

Die bisher bekannten Auswirkungen der intrazellulären Lokalisation der HIPKs auf ihre Funktion sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

### **1.2.6.1 Die Bedeutung von SUMO und SUMO-bindenden Motiven in HIPK2 für die intrazelluläre Lokalisation und Protein / Protein-Wechselwirkungen**

Der Zellkern beinhaltet viele hochstrukturierte Kompartimente, zu denen der Nukleolus, die Cajal Körperchen und die PML-NBs gehören [15]. PML ist ein Tumorsuppressor, der zu Körperchen im Kern akkumuliert [59]. Diese PML-NBs beinhalten eine Vielzahl an Proteinen, die an der Regulierung des Zellwachstums, der Apoptose und der genetischen Stabilität beteiligt sind. Dauerhaft befinden sich PML und SP100 in PML-NBs. Weitere Proteine können rekrutiert werden. Zu diesen zählen p53, CBP und auch HIPK2. Möller et al. fanden 2003 heraus, dass viele Funktionen von HIPK2 an den Aufenthalt in PML-NBs gebunden sind. So findet zum Beispiel die Phosphorylierung von p53 durch HIPK2 in PML-NBs statt und auch seine antiproliferative Funktion ist strikt an diese Körperchen gebunden. Allerdings hat man herausgefunden, dass die Isoform PML-III HIPK2 nicht rekrutieren kann, während PML-IV eine vollständige Rekrutierung in PML-NBs erreicht. Die Frage, ob PML auch für die Bildung der HIPK-Domänen essentiell ist, wurde überprüft, indem Fibroblasten untersucht wurden, denen PML fehlt. Aber auch in diesen PML-/- Fibroblasten traten HIPK-Domänen auf. Demnach findet also die Bildung von HIPK-Domänen unabhängig von PML statt, während einige Funktionen von HIPK2 von dem Aufenthalt in PML-NBs abhängig sind [15].

Um die HIPK2-Domänen zu formieren ist die C-terminale Region von HIPK2 notwendig [32]. Des Weiteren wird sie aber auch für die Interaktion von HIPK2 mit anderen Proteinen benötigt. So stellten Rinaldo et al. die Hypothese auf, dass die Fähigkeit, zu Speckles zu akkumulieren, von der Fähigkeit der Kinase abhängt, mit anderen Proteinen interagieren zu können [68]. Roscic et al. haben herausgefunden, dass sich die HIPK-Domänen unter anderem auch mit PcG-Körperchen (*polycomb group*) überlappen [69].

Zusätzlich können die HIPKs mit SUMO-1 in ihrer N-terminalen Region sumoyliert werden [35]. SUMO-1 gehört zur Gruppe der mit Ubiquitin verwandten Polypeptide. Sumoylierung findet in vielen Bereichen wie der Regulierung der Transkription, der Proteinstabilität oder bei der Bildung von PML-NBs statt [70, 71]. Die Sumoylierung der HIPKs kann von UBC9 (*ubiquitin-like protein conjugating enzyme*) [27] und Pc2 (*polycomb group SUMO (E3) ligase*) durchgeführt werden [69]. Diese Sumoylierung beeinflusst zwar nicht von alleine die Speckle-Bildung von HIPK2 und ist unabhängig von ihrer Fähigkeit p53 zu aktivieren, jedoch wirkt sie auf die Korepressor-Aktivität

von HIPK2 ein und beeinflusst ihre Interaktion mit Groucho und die Aktivierung des JNK [28, 35, 37]. Roscic et al. haben gezeigt, dass die Pc2 SUMO E3 Ligase an HIPK2 bindet und mit dieser kolokalisiert. Des Weiteren zeigten Roscics Arbeiten, dass die Formierung zu HIPK-Domänen sowohl von der Sumoylierung von HIPK2 als auch seiner Kinaseaktivität abhängt [69]. Wie bereits in 1.3.7.2 erläutert, phosphoryliert HIPK2 p53 als Antwort auf DNA-Schäden. Durch den gleichen Stimulus phosphoryliert sie aber auch Pc2 an verschiedenen Stellen, unter anderem am Threonin 495, wodurch dessen Fähigkeit gesteigert wird, sich selbst und HIPK2 zu sumoylieren. Durch diese Sumoylierung von HIPK2 wird wiederum seine Aktivität als transkriptionaler Repressor gesteigert [31, 69]. Also hat die Kolokalisation der HIPK-Domänen mit PcG-Körperchen einen Einfluss auf die Repressoraktivität von HIPK2 als Antwort auf DNA-Schäden.

#### **1.2.6.2 Die Lokalisation von HIPK2 im AML1-Multiprotein-Komplex**

AML1 (*acute myeloid leukemia 1*) ist ein Transkriptionsfaktor, der einen Multiprotein-Komplex bildet, in dem unter anderem p300, CBP, PML, MOZ und HIPK2 vorzufinden sind. Dieser Komplex kann an DNA-Sequenzen binden, um die Transkription bestimmter Gene zu beschleunigen oder zu unterdrücken [72]. HIPK2 kann an AML1b und p300 binden und diese und MOZ phosphorylieren [73]. Li et al. fanden heraus, dass zwei Punktmutanten von HIPK2 (R868W und N958I) auffallend häufig in Krankheitsfällen mit AML und MDS (Myelodysplastisches Syndrom) aufgetreten sind [74]. Diese Mutationen befinden sich in der SRS-Region und beeinflussen so die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2.

#### **1.2.7 HIPK2 und seine Interaktionspartner**

HIPK2 kann mit vielen verschiedenen Proteinen interagieren. Die meisten der Partnerproteine binden am C-Terminus der Kinase. Die immer länger werdende Liste an Interaktionspartnern kann in verschiedene Gruppen unterteilt werden, bezogen auf die jeweilige Funktion. Zu nennen sind hier unter anderem die Regulation des Zellwachstums und der Apoptose, die transkriptionalen Funktionen und die Beeinflussung der hämatopoetischen Differenzierung. Während einige Proteine fast stöchiometrisch an ihre Partner binden, scheint HIPK2 auf höchst flexible und dynamische Art und Weise mit seinen Partnerproteinen zu interagieren. Dies könnte ein Indiz für die Relevanz von HIPK2 sein, die über so ein großes Repertoire von verschiedensten biologisch relevanten Funktionen verfügt. Die schematische Darstellung in Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die Interaktionspartner von HIPK2.

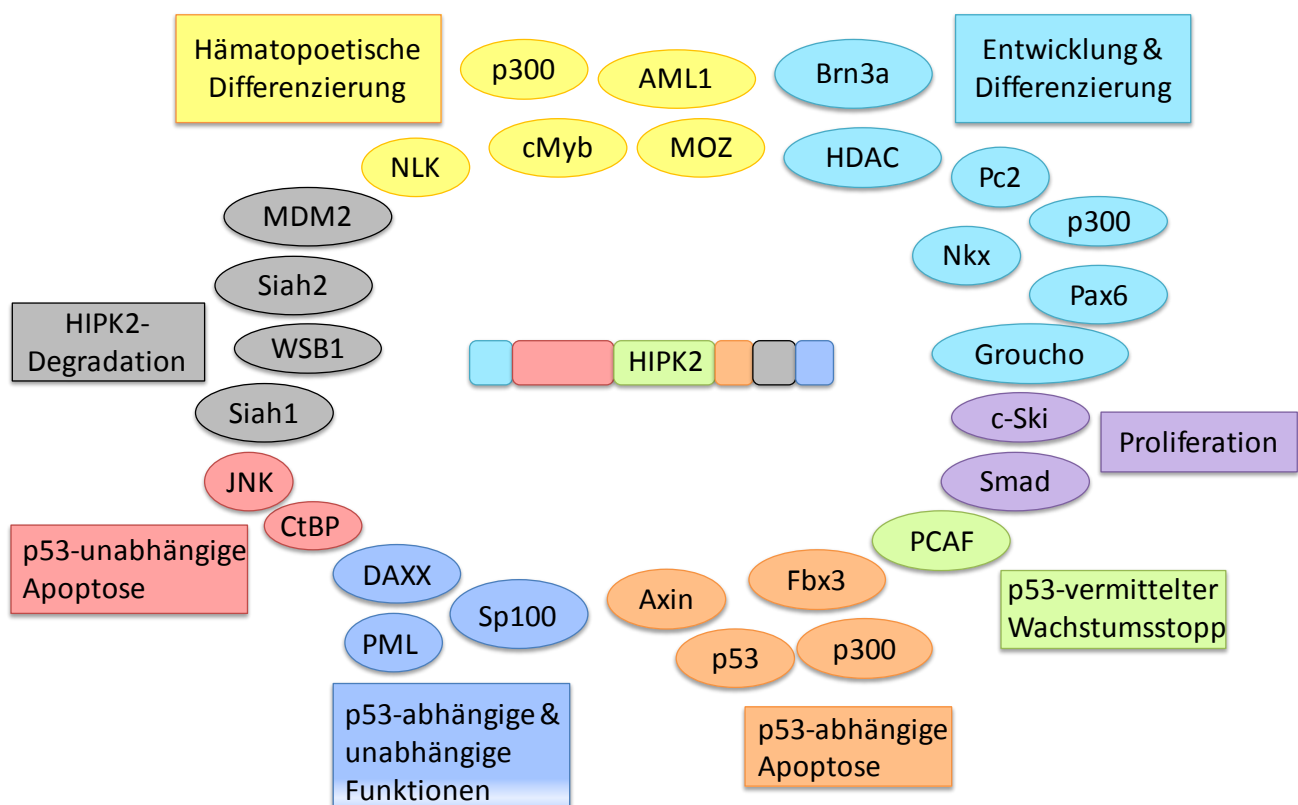


Abb. 1.5: HIPK2 und seine Interaktionspartner. Die Proteine sind ihren Funktionen entsprechend gruppiert und farblich gekennzeichnet.

## 1.3 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen

### 1.3.1 Der Zellzyklus – seine Funktion und die verschiedenen Phasen

Der Zellzyklus ist eine Abfolge zellulärer Ereignisse, die eine Körperzelle durchläuft, um sich in zwei identische Tochterzellen zu teilen [75]. Dieser Ablauf beinhaltet das Zellwachstum, die Verdopplung der DNA und die darauffolgende exakte Aufteilung der entstandenen Materie [76]. Tritt ein Fehler in diesem Ablauf auf, kann es zu genetischer Instabilität kommen und dadurch zur Entwicklung von Tumoren [77]. Um diese Abfolge genau koordinieren zu können, ist sie in verschiedene, zeitlich voneinander getrennte Phasen unterteilt, die Interphase und die Mitose (M-Phase). Diese sind wiederum in verschiedene Abschnitte gegliedert [78]. In der Mitose findet die Auftrennung in zwei Tochterzellen statt. Sie dauert zwischen 30 und 60 min und wird in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt [79]. Die Interphase befindet sich zwischen zwei



Zellteilungen und wird in drei Stadien gegliedert: Die G1- / G0-Phase, die S-Phase und die G2-Phase. Die G1-Phase ist die erste Phase und dauert, abhängig von der Art der Zelle, ca. 6 – 12 h. Sie ist durch intensives Zellwachstum mit hoher Protein- und RNA-Synthese gekennzeichnet. Während der G1-Phase kann die Zelle auch in einen Ruhezustand übergehen, in welchem sie dann zwischenzeitlich in der sogenannten G0-Phase verweilt. Auf die G1-Phase folgt die S-Phase (Synthese-Phase), in welcher die Replikation der DNA vollzogen wird. In den ca. 6 - 8 h, die diese Phase andauert, ist die Proteinsynthese gleichbleibend hoch wie zuvor in der G1-Phase, jedoch liegt nun der Schwerpunkt in der Synthese von Histonen. Als letztes folgt die G2-Phase. Während dieser ca. 3 - 4 h andauernden Phase werden die Proteine synthetisiert, die anschließend für die Kondensierung der Chromosomen benötigt werden. Des Weiteren erfolgt ein Korrekturlesen der DNA und gegebenenfalls die Reparatur fehlerhafter Stellen. Daran ist das Protein p53 zentral beteiligt, welches als Folge von DNA-Schäden aktiviert wird und einen Arrest des Zellzyklus hervorruft oder, bei irreparablen Schäden, sogar die Apoptose der Zelle einleitet [80]. Der DNA-Gehalt in der Zelle nimmt während des Zellzyklus stetig zu. Dies ist wichtig für das Verständnis der unter anderem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometrie.

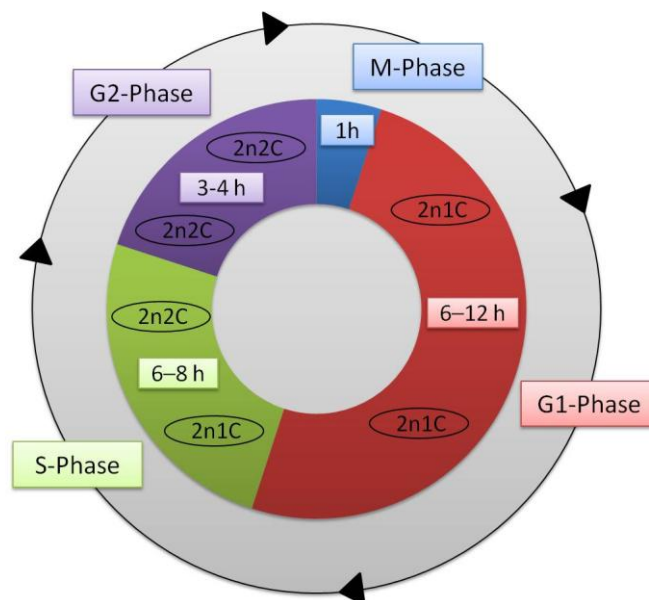


Abb. 1.6: Der Zellzyklus. Seine einzelnen Phasen sind farblich gekennzeichnet. Die durchschnittliche Dauer der Phasen und der DNA-Gehalt sind angegeben. n=Anzahl der Chromosomensätze, C=Anzahl der Chromatiden pro Chromosom

### 1.3.2 Die Regulation des Zellzyklus

Sogenannte Cyclin-Cdk-Dimere sind für das Voranschreiten in einem bestimmten Abschnitt des Zellzyklus verantwortlich [76]. Die *cyclin-dependent kinases* (Cdks) gehören zu der Familie der Serin / Threonin-Kinasen und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Damit die Cdks ihre Substrate phosphorylieren können, müssen sie an bestimmte Proteine der Cyclin-Familie binden und mit diesen Komplexe bilden. Die Cycline werden an bestimmten Kontrollpunkten des Zellzyklus synthetisiert und abgebaut [81]. Der Ablauf der G1-Phase wird von D-Typ-Cyclinen (Cyclin D1, D2 und D3) reguliert, indem diese die Cdks 4 und 6 aktivieren und so ein CyclinD-Cdk4/6-Komplex entsteht [82, 83]. Dieser überträgt Phosphatgruppen auf verschiedene Proteine welche die DNA-Replikation und Zentriolenverdopplung steuern. Dann erfolgt der Übergang von der G1- zur S-Phase. Auch an diesem scheint der CyclinD-Cdk4/6-Komplex beteiligt zu sein [84]. Zusätzlich steigt am Ende der G1-Phase der Gehalt an CyclinE-Cdk2-Komplexen stark an und flacht erst wieder ab, nachdem der Eintritt in die S-Phase erfolgt ist. Somit ist auch das Cyclin E ein vermeintliches G1-Cyclin, dass zusammen mit dem Cdk2 elementar am Übergang von der G1- zur S-Phase beteiligt ist [85, 86]. Die G2-Phase wird durch das Cdk2 gesteuert, welches mit Cyclin A einen Komplex bildet, dessen Konzentration während der gesamten G2-Phase hoch bleibt [87, 88]. Gleichzeitig bildet sich in der G2-Phase auch der CyclinB-Cdk1-Komplex. Dieser wird allerdings erst gegen Ende der G2-Phase aktiviert und steuert so den Übergang von der G2-Phase zur Mitose [89, 90]. Durch die beschriebene Herauf- und Herab-Regulation ergeben sich in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus jeweils unterschiedlich hohe Konzentrationen für die einzelnen Cycline [91], wie in der nachfolgenden Abbildung schematisch gezeigt wird. Diese unterschiedlich hohen Cyclin-Konzentrationen kann man unter anderem zur Analyse der Zellzyklusphasen nutzen.

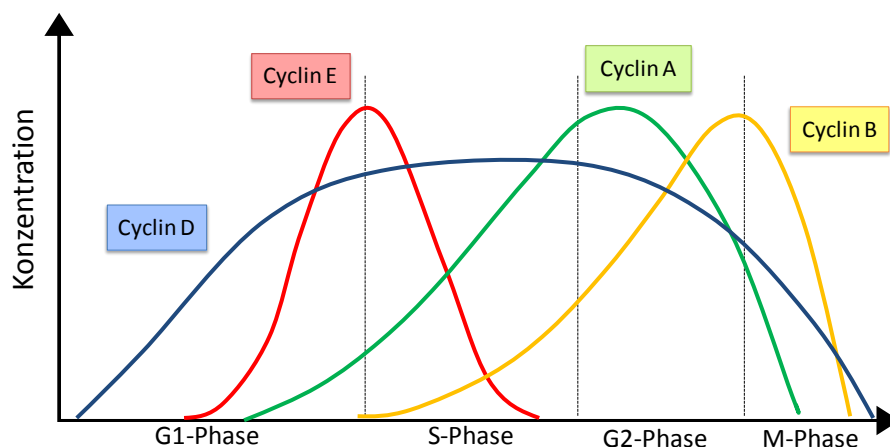


Abb. 1.7: Die Cyclinexpression. Die einzelnen Cycline sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und ihre Konzentration über den Verlauf des Zellzyklus dargestellt.

## 1.4 Ziele der Studie

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem endogenen HIPK2 und der besten Methode, dieses fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Hierzu wurden verschiedene Fixierungsmethoden und Antikörper getestet, um eine optimale Darstellung zu erreichen.

Da der Aktivierungsloop von HIPK2 bisher nicht untersucht ist, sollten verschiedene Punktmutanten mit phosphorylierbaren Aminosäuren der Aktivierungsschleife bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisierung untersucht werden.

Des Weiteren wurde analysiert, ob eine charakteristische Größe, Form und Verteilung der Speckles bei den einzelnen Mutanten existiert. Zu diesen Punkten erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob es unter Verwendung einer anderen Fixierungsmethode zu einem abweichenden Ergebnis kommt.

Zum Schluss erfolgte eine Versuchsreihe, in der untersucht wurde, ob die Zellzyklusphasen einen Einfluss auf die Lokalisierung des HIPK2-Proteins haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Produkt	Firma
Aceton	Merck
Acrylamid	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Aphidicolin	Fluka
Aprotinin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma
DMEM high glucose medium	Cell concepts
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Cell concepts
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hoechst 33342	Invitrogen
Isopropanol	Merck
Kaiser's Glycerol Gelatine	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	PAA
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Roth
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad
Nonidet P40 (NP40)	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Fluka
Plasmocin	Amaxxa
Propidiumjodid	Sigma
Roti-Fect	Roth

Produkt	Firma
SDS	Bio-Rad
Magermilchpulver	Merck
Thymidin	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Trypton	Roth
Tween 20	Gerbu
β-Mercaptoethanol	Fluka

## 2.2 Puffer und Lösungen

PBS137 mM	NaCl		
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,4
TBS-T (10x für Westernblot)	250 mM	Tris	
	1,37 mM	NaCl	
	50 mM	KCl	
	7 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	0,1 % (v/v)	Tween 20	pH 7,4
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8	
	25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	50 % (v/v)	Glycerol	
	10 % (w/v)	SDS	
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau	

SDS-Trenngel	350 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	7,5-15 % (v/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,04 % (v/v)	APS
	0,075 % (v/v)	TEMED
SDS-Sammelgel (5 %)	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	5 % (v/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,04 % (v/v)	APS
	0,3 % (v/v)	TEMED
SDS-Laufpuffer (5x)	125 mM	Tris
	960 mM	Glycin
	0,5 % (w/v)	SDS
Transferpuffer Westernblot	50 mM	Tris
	40 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,038 % (w/v)	SDS
NP-40 Lysepuffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 % (v/v)	NP-40
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 % (v/v)	Glycerol
	25 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 Bakterielle Nährmedien

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium (benannt nach Luria und Bertani) verwendet.

Zusammensetzung LB-Medium :	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl

Folgende Antibiotika wurden bei Bedarf beigemischt:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Für die Verwendung auf Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,6 % (w/v) Agar zugefügt.

### 2.3.2 DMEM-Medium zur Kultivierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden mittels DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kultiviert, dem stets folgende Substanzen hinzugefügt wurden:

10 % (v/v)	FCS (hitzeinaktiviert)
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
5 µg/ml	Plasmocin

## 2.4 Biologisches Material

### 2.4.1 Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK λ-rpsL (Str <sup>r</sup> ) nupG	Invitrogen

## 2.4.2 Eukaryontische Zellen

Zellen	Herkunft
U2OS	humane Osteosarkomzelllinie
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
A-549	humane Lungenkarzinomzelllinie
HeLa-Fucci	humane Zervixkarzinomzelllinie; modifiziert von Sakaue-Sawano et al. (2008)

## 2.5 HIPK2-Konstrukte

Vektor	Epitop-Tag	Name	Herkunft
pcDNA3	Flag	HIPK2-wt	M. L. Schmitz, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-K221A	M. L. Schmitz, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-Y354F	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-Y354/359F	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-Y354/360F	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-Y359/360F	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-3Y/F ( <i>Y354/359/360F</i> )	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-3Y/E ( <i>Y354/359/360E</i> )	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-3Y/T ( <i>Y354/359/360T</i> )	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-T353A	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-T353A/Y354F	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-S357A	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-Y354F/S357A	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-T353A/S357A	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-ST/A ( <i>S342/344/347/352/357A und T353A</i> )	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-3Y/F+ TS ( <i>Y354/359/360F, T353A und S357A</i> )	V. V. Saul, Gießen
pcDNA3	Flag	HIPK2-allSTY ( <i>S342/344/347/352/357A, T353A und Y354/359/360F</i> )	V. V. Saul, Gießen



## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft/Referenz
anti-Flag (M2)	Maus (monoklonal)	Sigma
anti-HIPK2	Kaninchen (polyklonal)	T.G. Hofmann et al. (2002)
Kontoll-IgG-Maus	Maus (monoklonal)	Santa Cruz Biotech
$\Delta$ C K 121	Meerschwein (polyklonal)	M.L. Schmitz
$\Delta$ C K 442	Meerschwein (polyklonal)	M.L. Schmitz
anti-Cyclin B1 (D-11)	Maus (monoklonal)	Santa Cruz Biotech
anti-Tubulin (tub2.1)	Maus (monoklonal)	Sigma

### 2.6.2 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Spezies	Herkunft/Referenz
anti-Kaninchen IgG Cy3	Ziege	Dianova
anti-Maus IgG Cy3	Ziege	Dianova
anti-Mehrschwein IgG Cy3	Ziege	Dianova

### 2.6.3 Sekundärantikörper für Westernblot

Bezeichnung	Spezies	Herkunft/Referenz
anti-Maus IgG	Ziege	Dianova

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* wurden mittels der  $\text{CaCl}_2$ -Methode hergestellt. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte entfernt und in einen mit 20 ml LB-Medium befüllten Erlenmeyerkolben überführt. Der Kolben wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Inhalt durch weitere 120 ml LB-Medium verdünnt und wiederum für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Hiernach erfolgte das Abkühlen für 15 min auf

Eis mit anschließendem Abzentrifugieren bei 4 °C und 4000 x g für 15 min. Der Überstand wurde entfernt, das entstandene Bakterienpellet in 25 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung suspendiert und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Ein weiteres Mal wurde die Lösung für 15 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Bakterienpellet mit 2,5 ml einer sterilen 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerol auf Eis resuspendiert. Die entstandenen chemisch kompetenten *E. coli* wurden zu je 100 µl in Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie dann bei -80 °C eingelagert wurden.

### 2.7.2 Transformation von Bakterien

Nach erfolgter Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* konnten diese zur Vervielfältigung verschiedener Plasmide verwendet werden. Ein Reaktionsgefäß mit 100 µl der bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und dann mit 1-3 µl der zu vervielfältigenden DNA zusammengebracht, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte das kurze Erhitzen der Lösung auf 42 °C für 2 min. Durch diesen Vorgang des Hitzeschocks erfolgte die Aufnahme der DNA durch die Bakterien. Weitere 2 min auf Eis folgten und dann wurden 800 µl antibiotikafreies LB-Medium hinzugefügt. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert und dann für 2 min abzentrifugiert. 600 µl des entstandenen Überstands wurden entfernt und das Pellet dann im verbliebenen LB-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Lösung auf vorbereiteten Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten die entstandenen Einzelkolonien zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet werden.

### 2.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Nach der erfolgten Transformation der DNA in Bakterien müssen diese kultiviert werden, um dann die gewünschte DNA in vervielfältigter Menge wieder isolieren zu können. Dies geschah mithilfe des JETSTAR Plasmid Kits der Firma GENOMED. Zur Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab wurden 150 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (2.1.2) mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml E1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde der Zellsuspension 10 ml E2-Puffer zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden zur Neutralisation 10 ml des E3-Puffers dazugegeben, der Inhalt durch Schwenken gut gemischt und dann für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde die

Anionenaustauschersäule des oben genannten Kits mit 30 ml E4-Puffer äquilibriert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand über ein Filterpapier auf die Säule gegeben. Diese wurde, nach dem vollständigen Durchtropfen der DNA-Lösung, mit 60 ml des E5-Puffers gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml E6-Puffer eluiert, in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und durch die Zugabe von 11 ml Isopropanol gefällt. Weiterführend wurde die gesammelte Flüssigkeit in dem Röhrchen wieder bei 12.000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde dem Röhrchen 10 ml 70%iges Ethanol zugefügt, wieder zentrifugiert und dann der Überstand entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde zum Trocknen auf den Kopf gestellt. Als von der DNA nur noch ein weißer Punkt zu sehen war, wurde sie in 200 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie.

## **2.8 Zellbiologische Methoden**

### **2.8.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

#### **2.8.1.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen**

Um Kontaminationen zu vermeiden wurden alle Arbeiten mit den oben genannten humanen Tumorzellen ausschließlich unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Des Weiteren wurden nur Zellkulturmaterialien verwendet, die zuvor sterilisiert wurden oder steril verpackte Einmalartikel.

#### **2.8.1.2 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen**

Die Kultivierung der genannten Zelllinien (2.1.4.2) erfolgte in DMEM in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden bei 37 °C, 97 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> gezüchtet. Alle zwei bis drei Tage erfolgte die Aufteilung und erneute Aussaat der Zellen. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und dann mit 3 ml Trypsin/EDTA bedeckt und so ca. 3 min im Inkubator bei 37 °C belassen. Eine Kontrolle der Ablösung aller Zellen erfolgte unter dem Mikroskop, um dann im Anschluss die Aktivität des überschüssigen Trypsins mit 7 ml DMEM abzustoppen. Zwischen 10 und 20 % der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit DMEM auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt.

### 2.8.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde ein Einfriermedium mit 1 ml 90 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO auf Eis vorbereitet. Die einzufrierenden Zellen wurden für 5 min bei 200 x g abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet, mit einem minimalen Volumen von 100 µl, wurde in 1 ml des vorbereiteten Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryo-Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte das Einfrieren bei -80 °C für zwei Tage. Nach diesen zwei Tagen erfolgte die Lagerung beim -150 °C.

Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Kryo-Reaktionsgefäß direkt nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Sobald der Inhalt flüssig war, wurde dieser in ein Schraubdeckelröhrchen mit 9 ml DMEM überführt und für 3 min abzentrifugiert (200 x g). Das überschüssige Medium wurde entfernt, das Zellpellet in 10 ml frischem DMEM resuspendiert und dann der gesamte Inhalt des Schraubdeckelröhrchens in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C inkubiert.

### 2.8.2 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion aller genannten Zelllinien wurde Roti-Fect verwendet. Es wurde gemäß den Herstellerangaben (Roth) angewendet. Roti-Fect ist eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids. Es bildet Komplexe mit der DNA, nachdem diese zu kompakten Strukturen kondensiert wurde. Durch diese Kondensierung und anschließende Komplexbildung wird eine hocheffiziente Aufnahme in eukaryontische Zellen ermöglicht. Standardmäßig wurden zur Transfektion von 1 µg DNA 2 µl Roti-Fect verwendet. Die Zellen wurden ca. 24 h vor der Transfektion in einer 12-Loch-Platte auf Deckgläschen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 50 bis 80 % erreicht hatten. Es wurden zwei Ansätze vorbereitet. Der Erste enthielt 75 µl DMEM (ohne FCS, L-Glutamin und Antibiotikum) gemischt mit 0,8 bis 1,2 µg der zu transfizierenden DNA. Der zweite Ansatz bestand aus 75 µl DMEM (ohne FCS, L-Glutamin und Antibiotikum) gemischt mit 2 µl Roti-Fect. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander gemischt. Danach folgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen vorbereitet, indem das alte Medium abgesaugt wurde, die Zellen einmalig mit vorgewärmtem PBS gewaschen wurden und dann jede Vertiefung mit 500 µl DMEM (plus 10 % FCS) befüllt wurde. Nach Ablauf der 20 min konnte die Lösung mit den Nukleinsäure-Lipidkomplexen vorsichtig auf die Zellen geben werden. Die 12-Loch-Platte wurde im Anschluss für 2 – 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und pro Vertiefung durch 1 ml DMEM

(mit FCS, L-Glutamin und Antibiotikum) ersetzt. 24 bis 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz (2.2.3.2) fixiert.

### 2.8.3 Synchronisation

Bei der Synchronisation von Zellen werden diese in ihrem normalen Zellzyklus angehalten, so dass sie sich alle in der gleichen Phase befinden, um dann synchron in die nächste Phase einzuwandern. Bei der Synchronisation mit Thymidin und Aphidicolin wird die Aktivität der DNA-Polymerase reversibel gehemmt, was zur Folge hat, dass die Zellen an der Grenze zwischen der G1- und der S-Phase (1.3.2) in ihrem Zellzyklus gestoppt werden. Nach dem Entfernen der Polymerasehemmer treten die Zellen in die S-Phase ein und durchlaufen wieder ungehindert den Zellzyklus.

Die zu synchronisierenden Zellen wurden 24 h zuvor auf Deckgläschen in 12-Loch-Platten oder 6 cm-Schalen ausgesät, so dass ihre Dichte zum Zeitpunkt der Synchronisation 50–70 % betrug. Die nachfolgenden Angaben entsprechen der Arbeit mit 12-Loch-Platten, wobei jeweils die Mengen für eine Vertiefung angegeben sind. Bei der Arbeit mit 6-cm-Schalen wurde identisch verfahren, jedoch mit entsprechend erhöhten Mengen pro Schale. Das vorhandene Medium wurde entfernt und durch 700 µl DMEM mit 2 mM Thymidin ersetzt, worin die Zellen 14 h bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dieser Zeit erfolgten drei Waschvorgänge mit je 1 ml PBS, bevor dann pro Vertiefung 1 ml DMEM für 11 h appliziert wurde. Im Anschluss wurde das Medium wieder entfernt und durch 1 ml Medium mit 1 µg/ml Aphidicolin ersetzt. Es folgte eine Inkubation für wiederum 14 h bei 37 °C. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd auf den Deckgläschen ist im Abschnitt 2.9.1 beschrieben. Das Vorgehen bei der Fixierung mit 6-cm-Schalen ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

### 2.8.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, mit dem Zellen gezählt werden können und gleichzeitig ihre Größe und ihr DNA-Gehalt bestimmt werden. Hierzu werden die Zellen der Reihe nach durch eine Messzelle gesaugt und dort mit einem Laser bestrahlt. Es gibt zwei sogenannte Streulichtdetektoren, die die dabei entstehende Streuung messen. Der *Forward-Scatter* misst die Größe der bestrahlten Zellen. In einem 90°-Winkel dazu befindet sich der *Side-Scatter*,

der sowohl die Größe der Zellen, als auch deren DNA-Gehalt misst. Zusätzlich kann mit der Durchflusszytometrie auch ein Fluoreszenzsignal erkannt werden. Dies funktioniert allerdings bei den meisten Zellen nur, wenn zuvor bestimmte Strukturen in diesen Zellen durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden.

Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurde die DNA mittels Propidiumjodid (PI) angefärbt. Zunächst wurden die entsprechenden Zellen (HeLa-Zellen) auf 6-cm-Schalen ausgesät und synchronisiert (2.8.2). Nach der Synchronisation erfolgte die Fixierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Fixierung der ersten Probe fand direkt nach dem Abstoppen der Synchronisation statt (0 h), die weiteren nach 3 h, 6 h, 8 h und 10 h. Zusätzlich gab es einen asynchronen Satz Zellen, der ebenfalls für die Messung fixiert wurde. Zum Fixieren der Zellen wurden diese auf ihrer 6-cm-Schale trypsinisiert (1 ml). Das überschüssige Trypsin wurde nach 3 min mit 4 ml DMEM inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 200 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS resuspendiert. Tröpfchenweise wurden 3 ml 70%iges Ethanol (-20 °C) dazugegeben und die Probe dann bei -20 °C eingefroren. Zum Zeitpunkt der Messung wurden alle sechs Reaktionsgefäße wieder aufgetaut und abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets jeweils in 2 ml PBS resuspendiert. Jede Probe wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, so dass je zwei Röhrchen mit 1 ml suspendierten Zellen vorhanden waren. Ein Probensatz wurde ungefärbt gemessen, der andere wurde vor der Messung mit PI angefärbt (siehe unten). Alle Proben wurden in ihren Reaktionsgefäßen noch einmal abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen, mit denen die ungefärbte Messung durchgeführt wurde, wurden in 400 µl PBS resuspendiert und dann in das Durchflusszytometer eingespannt und gemessen. Bei den sechs anderen Proben wurden die Zellen in 400 µl einer Färbelösung suspendiert und bei Raumtemperatur für 30 min unter Ausschluss von Licht inkubiert. Der Färbemix bestand aus 5,58 ml PBS, 120 µl RNase und 300 µl PI. Das PI lagert sich zwischen die Basen der DNA ein und macht diese so für die Streulichtdetektoren des FACS-Gerätes sichtbar. Durch diesen roten Farbstoff kann die DNA in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus quantifiziert werden, wobei die geringste Menge an DNA in der G0 / G1-Phase auftritt und die höchste Menge in der G2- und M-Phase. Die Menge an DNA wird in den Histogrammen auf der X-Achse dargestellt (FL2-A), während die gezählten Events (Counts), also die Anzahl der Zellen, die mit der entsprechenden Menge an DNA vorhanden sind, auf der Y-Achse abgebildet sind.

### **2.8.5 Herstellen von Zelllysaten**

Um die Proteine mittels Westernblot (2.10.2) analysieren zu können, müssen die entsprechenden Zellen lysiert und die Proteine extrahiert werden. Die Zellen wurden hierzu, abhängig von ihrer Adhäsion, entweder mit 1 ml PBS von den 6-cm-Schale abgespült oder mit einem Schaber abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt, das auf Eis gelagert war. Danach wurden sie für 2 min bei 800 x g abzentrifugiert und der Überstand im Anschluss vorsichtig entfernt. Auf das verbliebene Zellpellet wurden dann, abhängig von dessen Größe, 50–100 µl NP40-Lysepuffer gegeben. Das Zellpellet wurde im Lysepuffer vorsichtig auf- und abpipettiert, ohne dabei Schaum zu erzeugen, bis es sich aufgelöst hatte und dann für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 16.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches bereits 5-fach SDS-Puffer enthielt, mit diesem gemischt und für 3 min bei 95 °C aufgeköcht. An dieser Stelle konnten die Proben entweder auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden oder zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

## **2.9 Immunfluoreszenz**

### **2.9.1 Verschiedene Fixierungen**

Die zu untersuchenden überexprimierten Proteine wurden mittels Transfektion in die genannten eukaryontischen Zellen eingebracht (2.1.8.4), durch fluoreszierende Antikörper markiert und unter einem Mikroskop analysiert. Die adhärenenten Zellen wurden in 12-Loch-Platten auf Deckgläschen kultiviert. Um diese Zellen und die überexprimierten Proteine adäquat unter dem Mikroskop betrachten zu können, mussten sie auf dem Deckgläschen fixiert werden und dann mit diesem auf einen Objektträger überführt werden. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenz beschrieben. Drei dieser Methoden wurden verwendet und sind nachfolgend beschrieben.

#### **2.9.1.1 Fixierungsmethoden**

Bei der Methanol / Acetonfixierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann für 1 min in einer 1:1 Ethanol:Aceton-Lösung (-20 °C) inkubiert. Danach wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Zellen auf den Deckgläschen getrocknet. Im Anschluss

erfolgte die Rehydrierung mit PBS für 10 min.

Eine weitere angewandte Methode ist die Fixierung in 100%igem Methanol. Auch hier wurden die Zellen, wie bei allen drei Methoden, vor dem Fixieren zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation in 100%igem Methanol für 5 min bei -20 °C. Im Anschluss wurden die Zellen erst getrocknet und dann, wie oben bereits beschrieben, mit PBS für 10 min rehydriert.

Die dritte verwendete Methode ist die Fixierung durch Paraformaldehyd. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden für 15 min in frisch angesetztem 3%igem (w/v) Paraformaldehyd inkubiert. Danach mussten sie zweimal für 5 min in PBS gewaschen und für 10 min in 0,2%igem (v/v) Triton-X-100 (mit 0,5 % (v/v) Ziegen Serum) inkubiert werden. Triton-X-100 sorgt für eine Permeabilisierung der Zellwand, damit bei der anschließenden Antikörperfärbung die Antikörper in die Zelle eindringen können. Nach der 10-minütigen Inkubation mit Triton-X-100 erfolgten zwei weitere 5-minütige Waschvorgänge mit PBS, bevor die Zellen geblockt werden konnten.

### **2.9.2 Antikörperfärbung**

Nach der Fixierung folgte der Blockvorgang mit 10 % (v/v) Ziegen Serum in PBS, in dem die Zellen für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Dieser und alle nachfolgenden Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Nach Entfernen der Blocklösung wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (2.6.1) in einer Lösung aus PBS und 1 % (v/v) Ziegen Serum inkubiert. Dies geschah entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (2.6.2) in 1 % (v/v) Ziegen Serum in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei weitere 10-minütige Waschschritte mit PBS und dann in den meisten Fällen die Kernfärbung mit Hoechst. Hierzu wurden die Zellen für 8 min in PBS mit 1 µg/ml Hoechst bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal für 10 min in PBS gewaschen und die Deckgläschen dann auf einen Objektträger überführt. Hierzu wurde Kaiser's Glycerol Gelatine angewärmt, ein Tropfen auf den Objektträger gegeben, das Deckgläschen auf die Gelatine gelegt und leicht angedrückt. Damit die Gelatine sich wieder verfestigen konnte, wurden die Objektträger anschließen über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit 70%igem Ethanol gesäubert und die Deckgläschen mittels Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Nun erfolgte die Betrachtung der Zellen und die Analyse der angefärbten überexprimierten Proteine unter einem Nikon Eclipse 2000E Mikroskop.



## 2.10 Statistische Auswertung der Experimente

Zur Auswertung der überexprimierten HIPK2 wurden pro HIPK2-Mutante jeweils drei unabhängige Färbungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an insgesamt mindestens 100 Zellen, die aus diesen drei Färbungen ausgewählt wurden. Apoptotische und mitotische Zellen sowie Zellen mit einer auffallend hohen Menge an HIPK2 wurden hierbei nicht berücksichtigt, da sie im Bezug auf die Fragestellung die Ergebnisse verfälscht hätten. Nur augenscheinlich intakte und gesunde Zellen wurden einbezogen. Zur statistischen Auswertung wurde die Standardabweichung für jeden auftretenden Phänotyp jeder Mutante ermittelt. Diese lag jeweils unter 20% und ist daher in den nachfolgend gezeigten Abbildungen nicht mehr zusätzlich aufgeführt. Bei der Auswertung der Diagramme wurden nur starke Veränderungen diskutiert und bewertet, da die verwendete Methode der hier durchgeführten Experimente keine Schlüsse über kleinere Abweichungen zulässt.

## 2.11 Proteinbiochemische Methoden

### 2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Bei normalen Gelelektrophoresen werden die Moleküle durch ihre unterschiedliche Ladung aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE stehen die Ladungen jedoch im Hintergrund, da durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu den Proben die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und sie alle eine einheitlich negative Ladung aufweisen. So können sie anhand ihrer Größe getrennt werden, ohne dass die Ladungen einen Einfluss nehmen. Die kleinen Proteine können hierbei schneller durch die Gitternetzstruktur des Gels laufen als die großen Proteine und befinden sich so bei der Betrachtung weiter unten auf dem Gel. Je nachdem, wie groß das Protein ist, das von Interesse ist, werden Trenngele zwischen 8 % und 15 % gegossen. Die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele sowie des benötigten SDS-Laufpuffers sind unter 2.2 aufgeführt. Nach dem Zusammenbauen der Gelkammer wurde zuerst das sogenannte Trenngel gegossen, indem sich die Proteine der Größe nach auftrennen. Nach dem Gießen wurde das Gel mit einer Schicht Isopropanol überdeckt, damit es zu einem sauberen Abschluss kam. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, der obere Rand des Gels mit Wasser abgespült und dann mit einem Tuch abgetupft. Im Anschluss erfolgte das Gießen des Sammelgels oberhalb des Trenngels. In das Sammelgel wurde noch im flüssigen Zustand ein Kamm gesteckt, der die späteren Ladetaschen für die Proben ausformt. Nach abgeschlossener Polymerisation des

Sammelgels wurden die bereits vorbereiteten, zu untersuchenden Proben in die Taschen geladen. Das Gel wurde bei einer Spannung von 100 bis 140 V laufen gelassen, bis eine deutliche Trennung der Proteine erfolgt war.

### 2.11.2 Westernblot

Der Westernblot ist eine Methode um die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen, um sie dann dort mittels immunologischer Methoden nachzuweisen. Dieser Vorgang erfolgte in einer Transferkammer nach dem Semi-Dry-Verfahren, in der das Polyacrylamidgel auf die entsprechende Membran gelegt wurde. Durch ein elektrisches Feld erfolgt die Übertragung der Proteine auf die Membran, wo sie dann durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Sobald dies geschehen ist, können die Proteine auf der Membran durch verschiedene Methoden dargestellt werden. Vor dem Einbringen in die Transferkammer wurde die Membran für 15–30 sec in Methanol inkubiert und anschließend in Transferpuffer getaucht. Die Blotkammer wurde zwischenzeitlich vorbereitet, indem die Platinelektroden mit Transferpuffer befeuchtet wurden und zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere aufgelegt wurden. Auf diese wurde dann die angefeuchtete Membran gelegt, gefolgt von dem Polyacrylamidgel, welches die aufgetrennten Proteine enthielt. Zum Schluss wurde dieser Stapel von zwei weiteren in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren bedeckt und die Kammer geschlossen. Zum Transfer der Proteine wurden 24 V für ca. zwei Stunden angelegt. Im Anschluss wurde die Membran für 20 min in einer Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (2.6.1) in 2 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen, bevor sie dann mit dem sekundären Antikörper (2.6.3) in 2 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T konnten die mit Antikörpern versehenen Proteine mithilfe eines Chemolumineszenz-Verfahrens auf einem Röntgenfilm dargestellt werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der endogenen HIPK2

Die Darstellung der endogenen HIPK2 unter dem Mikroskop mittels Immunfluoreszenz gestaltet sich schwierig. Um eine optimale Darstellung zu erlangen, wurde mit verschiedenen Arten der Fixierung gearbeitet. Des Weiteren erfolgte die Verwendung verschiedener Antikörper zur Anfärbung, wobei jeweils auch die Konzentration variiert wurde. Da A-549-Zellen (2.4.2) naturgemäß eine höhere Expression an HIPK2 aufweisen als die anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, wurde diese humane Lungenkarzinomzelllinie hier verwendet.

#### 3.1.1 Bestimmung der optimalen Fixierungsmethode zur Darstellung der endogenen HIPK2

Die Fixierung mit Methanol / Aceton ist sehr einfach und schnell durchzuführen (2.9.1.1) und man erhält für die überexprimierte HIPK2 gute Ergebnisse (3.2.2). Um die ideale Fixierung für die Darstellung der endogenen HIPK2 zu finden, wurde hier die Inkubationszeit mit Methanol / Aceton variiert. Die Zellen wurden sowohl für 1 min als auch für 5 min in der entsprechenden Lösung inkubiert und dann, nach erfolgter spezifischer Färbung, auf einen Objektträger überführt und unter dem Mikroskop mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Die für 1 min inkubierten Zellen zeigten bei relativ geringem Hintergrundrauschen keine spezifische Anfärbung der endogenen HIPK2. Auch eine Inkubationszeit von 5 min zeigte keine Verbesserung. Trotz des starken Hintergrundsignals war die endogene HIPK2 nicht angefärbt.

Bei der Fixierung mit 100%igem Methanol (2.9.1.2) wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Inkubationszeiten getestet. Sowohl bei der 5-minütigen, als auch bei der 10-minütigen Inkubation ergab sich ein stärkeres Hintergrundrauschen als bei der einminütigen Fixierung mit Methanol / Aceton. Zusätzlich war auch hier keine erkennbare spezifische Färbung der endogenen HIPK2 aufgetreten.

Als weitere Alternative wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) und Triton-X-100 fixiert (2.9.1.3). Unterschiedliche Konzentrationen von Paraformaldehyd (2% und 4%), wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Triton-X-100 (0,1 %, 0,3 % und 0,5 %) getestet. Bei allen Fixierungen mit 2%igem PFA zeigte sich ein wesentlich höheres Hintergrundsignal als bei 4%igem PFA. Des Weiteren wirkten die Zellen bei 4%igem PFA klarer abgegrenzt. Bei der Verwendung von 0,5%igem Triton-X-100 kam es auf den Präparaten immer wieder zum Auftreten von

unspezifischen Farbflecken. 0,5%iges Triton-X-100 scheint demnach bei einer Inkubationszeit von 10 min zu stark zu sein, so dass vermehrt Artefakte auftreten. Bei 0,1- und 0,3%igem Triton-X-100 kam es nicht zu den erwähnten Farbflecken. Die beiden Konzentrationen zeigten ein gleich gutes Ergebnis. Somit waren bei der Fixierung mit PFA die beiden einzigen Präparate, die ein ausreichend scharfes Bild gezeigt haben und nur sehr wenig Hintergrundrauschen aufwiesen, die Fixierungen mit 4%igem PFA in Verbindung mit 0,1%igem und 0,3%igem Triton-X-100. Bei manchen Zellen dieser Deckgläschen waren vereinzelt kleine angefärbte Pünktchen im Zellkern erkennbar, was auf eine Färbung der endogenen HIPK2 hindeuten könnte. Jedoch waren diese Speckles nicht in allen Zellen zu finden, so dass offen bleibt, ob es sich tatsächlich um spezifisch angefärbte endogene HIPK2 handelt. Festzuhalten ist, dass die beiden oben genannten Kombinationen aus PFA und Triton-X-100 ein gutes Fixierungsergebnis geliefert haben, und dass dies die einzige Methode ist, bei der nukleare Speckles zu sehen waren.

### **3.1.2 Identifizierung der geeigneten HIPK2-Antikörper**

Alle im Folgenden erläuterten Versuche wurden mit den drei oben genannten Arten der Fixierung durchgeführt, wobei die hier aufgelistete Auswertung sich nur auf die mit PFA und Triton-X-100 fixierten Zellen bezieht, da sich diese Methode als die effektivste herausgestellt hat (3.1.1). Die hier aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurden zuvor am überexprimierten HIPK2-Wildtyp getestet um sicherzustellen, dass sie funktionieren. Als erstes kam der Primärantikörper anti-HIPK2 (2.6.1) in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 in Kombination mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG Cy3 (2.6.2) zum Einsatz. Bei keiner der verwendeten Konzentrationen war eine spezifische Anfärbung der endogenen HIPK2 zu erkennen. Als nächstes wurden die Primärantikörper  $\Delta$ C K 121 und  $\Delta$ C K 442 (2.6.1) in den Verdünnungen 1:300, 1:1500, 1:2000 und 1:4000 getestet. Der entsprechende Sekundärantikörper war hier jeweils anti-Mehrschwein IgG Cy3 (2.6.2) in den Verdünnungen 1:1500, 1:3000 und 1:5000. Bei der Konzentration 1:300 der Primärantikörper waren die Präparate viel zu hell angefärbt und es entstand ein sehr hohes Hintergrundrauschen, so dass keine Aussage über eventuell angefärbte endogene HIPK2 getroffen werden konnte. Bei den Konzentrationen 1:1500, 1:2000 und 1:4000 waren bei beiden Primärantikörpern einzelne Zellen zu finden, in deren Kern kleine angefärbte Pünktchen zu erkennen waren. Allerdings nahm diese Beobachtung ab, je stärker die Verdünnung des Sekundärantikörpers wurde. Bei einer Verdünnung von 1:5000 des Sekundärantikörpers war keine Färbung mehr erkennbar.

### 3.1.3 Die geeignetste Kombination aus Fixierungsmethode und Antikörperfärbung

In Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass die Fixierung mit 4%igem PFA und 0,1- oder 0,3%igem Triton-X-100 die Methode der Wahl ist. Um die endogene HIPK2 darzustellen wurden im Anschluss die verschiedenen Primär- und Sekundärantikörper getestet. Bei keinem der oben aufgeführten Versuche war ein vollständig zufriedenstellendes Ergebnis zu vermerken. Jedoch waren bei den Färbungen mit den Primärantikörpern  $\Delta C K 121$  und  $\Delta C K 442$  (1:1500 bis 1:4000) in Kombination mit dem Sekundärantikörper anti-Mehrschwein IgG Cy3 (1:1500) in mit PFA fixierten Zellen, kleine angefärbte Pünktchen im Kern einzelner Zellen erkennbar. Allerdings waren diese Speckles nicht bei allen Zellen zu sehen. Zudem war das Signal so schwach, dass ein gutes Foto nicht zu verwirklichen war. Demnach bleibt festzuhalten, dass die oben genannte Kombination aus Fixierung und Antikörpern eine sehr vielversprechende ist, die Ergebnisse aber nicht ausreichen, um eine eindeutige Färbung der endogenen HIPK2 reproduzierbar verwirklichen zu können.

## 3.2 Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 nach Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife

HIPK2 stellt sich in seiner aktiven Form in eukaryontischen Zellen in sogenannten Speckles im Zellkern dar [14]. Die Entstehung und Bedeutung dieser Körperchen wurde im Abschnitt 1.1 erläutert. Des Weiteren ist bekannt, dass eine Punktmutation des Lysins an der Stelle 221 eine Inaktivierung der Kinasefunktion von HIPK2 verursacht. Diese HIPK2-Mutante bildet keine Speckles mehr, sondern kommt im Kernplasma verteilt vor [15]. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Kinaseaktivität und intrazellulärer Lokalisierung war es interessant zu untersuchen, inwieweit sich Mutationen in der HIPK2-Aktivierungsschleife auf die Lokalisation der entsprechenden Mutante in eukaryontischen Zellen auswirken.

### 3.2.1 Die auftretenden Phänotypen

Die zu untersuchenden HIPK2-Mutanten (2.5) wurden mittels Transfektion in U2OS-Zellen eingebracht. Die mikroskopische Immunfluoreszenz-Analyse ergab bezüglich der Verteilung in der Zelle verschiedene Phänotypen. Die vier am häufigsten aufgetretenen Varianten sind hier kurz beschrieben. In der Abbildung 3.1 ist als erstes der Phänotyp 1 gezeigt (a), der vom HIPK2-Wildtyp bisher bekannt ist. Hier zeigen sich fast ausschließlich Speckles im Kern. Bei der zweiten

aufgeführten Variante (b) befinden sich wieder Speckles im Kern, aber zusätzlich treten auch noch Speckles im Zytoplasma auf, die jedoch etwas kleiner ausfallen und weniger stark fluoreszieren als die Speckles des Nukleus (Phänotyp 2). In der dritten dargestellten Bildserie (c) verteilt sich HIPK2 im Kernplasma ohne zu Speckles zu akkumulieren. Wie bereits aus vielen vorangegangenen Studien bekannt, korrespondiert dieses typische Bild mit kinase-inaktiven HIPK2-Mutanten (Phänotyp 3). Die letzte aufgetretene Variante (d) zeigt die diffuse Verteilung von HIPK2 sowohl im Kern- als auch im Zytoplasma, wobei auch hier das Zytoplasma wieder etwas weniger stark fluoresziert als der Kern (Phänotyp 4). Es ergaben sich zwischenzeitlich auch Mischformen der hier aufgeführten Phänotypen, allerdings lag deren Häufigkeit stets weit unter 10 %, so dass sie in der Auswertung nicht mit aufgeführt werden. Dies ist für die späteren Auflistungen zu berücksichtigen, da die einzelnen Mutanten dadurch nicht immer auf 100 % in ihrer Verteilung kommen.

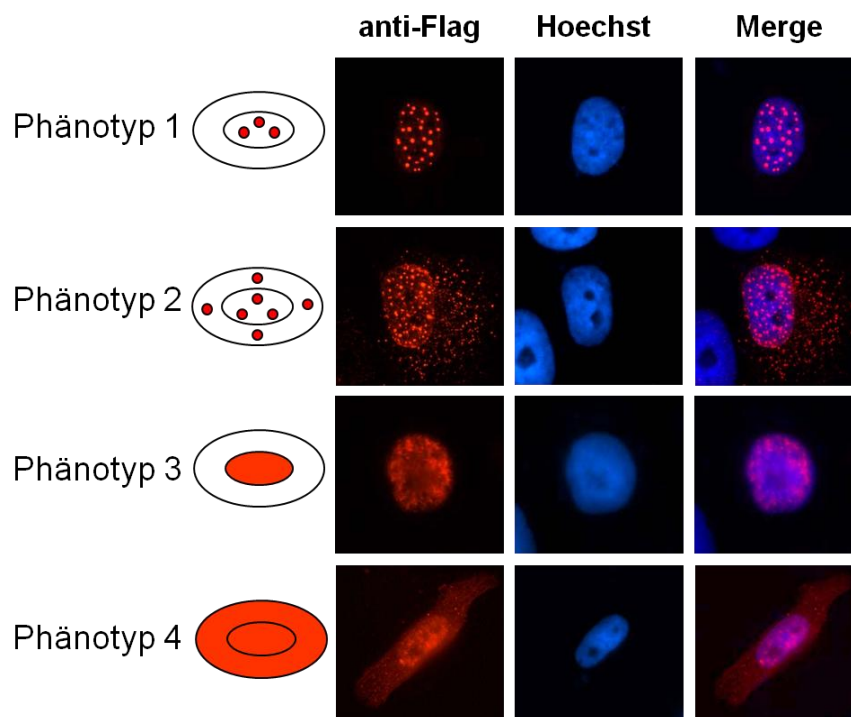


Abb. 3.1: Beispielbilder für die einzelnen Phänotypen. Die Klassifizierung der Phänotypen mit schematischen Abbildungen ist links gezeigt, während rechts beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Fotos von U2OS-Zellen diesen zugeordnet sind. Flag-HIPK2 wurde in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt.

### 3.2.2 Der mögliche Einfluss der Fixierungsmethode auf die Verteilung der Speckles

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden auch bei der überexprimierten HIPK2 die verschiedenen Fixierungsmethoden getestet um die effektivste und gleichzeitig effizienteste zu bestimmen. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Ergebnis für die endogene HIPK2 (für die eine Fixierung mit PFA und Triton-X-100 optimal war), erwies sich eine einminütige Fixierung mit Methanol / Aceton für die Darstellung der überexprimierten HIPK2 als gleichwertig. Bei allen drei Arten der Fixierung stellte sich eine ähnliche HIPK2-Verteilung ein, so dass ein signifikanter Unterschied bei den drei Methoden nur darin lag, dass das Hintergrundrauschen bei der Fixierung mit 100%igem Methanol viel höher war als bei den anderen beiden Methoden. Somit kam nur noch die Fixierung mit Methanol / Aceton oder mit PFA und Triton-X-100 in Frage. Allerdings erwies sich die Verwendung von PFA als wesentlich zeitintensiver, sodass bei gleichwertiger Darstellung der Zellen die Fixierung mit Methanol / Aceton die effizientere Methode war. Demnach wurde im weiteren Vorgehen ausschließlich die Fixierung mittels Methanol / Aceton-Methode angewandt.

### 3.2.3 Die Phänotypen der einzelnen HIPK2-Mutanten

Die zu untersuchenden HIPK2-Konstrukte (2.5) wurden, wie bereits oben erwähnt, mittels Transfektion in U2OS-Zellen eingebracht. Die Antikörperfärbung erfolgte mit dem Primärantikörper anti-Flag (M2) (1:5000) und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 (1:10000). Die dargestellten Fotos dokumentieren die intrazelluläre HIPK2-Lokalisation unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung. Pro Mutante wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt und jeweils einem der definierten Phänotypen (3.2.1) zugeordnet. So ergaben sich die nachfolgend gezeigten Verteilungen für die einzelnen HIPK2-Mutanten (Abb. 3.2a-f). Die Angaben erfolgen jeweils in Prozent, bezogen auf die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen je Mutante.

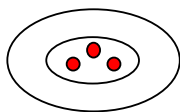
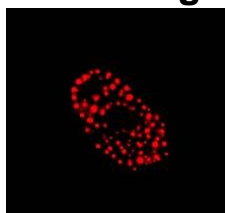
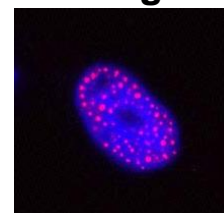
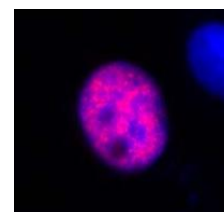
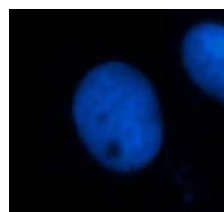
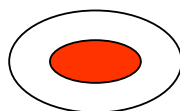
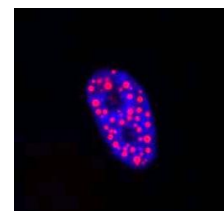
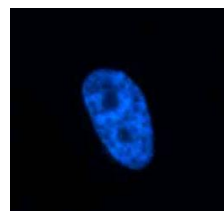
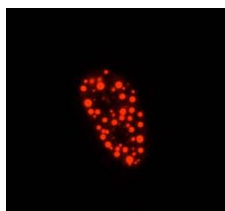
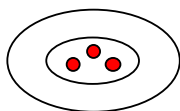
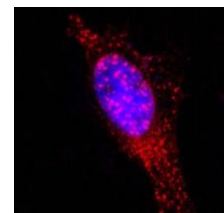
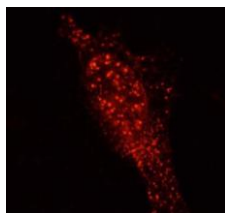
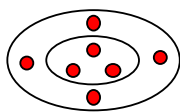
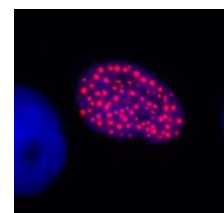
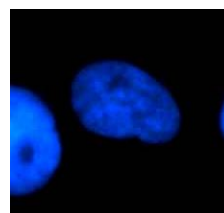
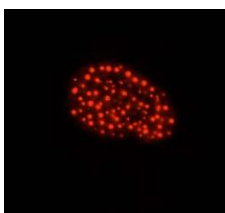
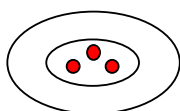
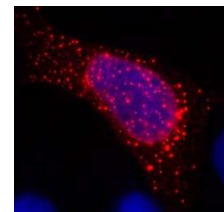
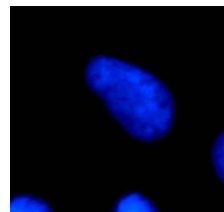
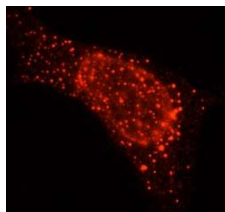
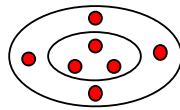
**Flag-HIPK2****wt****90 %****anti-Flag****Hoechst****Merge****K221A****82 %****Y354F****78 %****21 %****Y354/359F****70 %****25 %**

Abb. 3.2a: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Flag-HIPK2-wt und die gekennzeichneten Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.



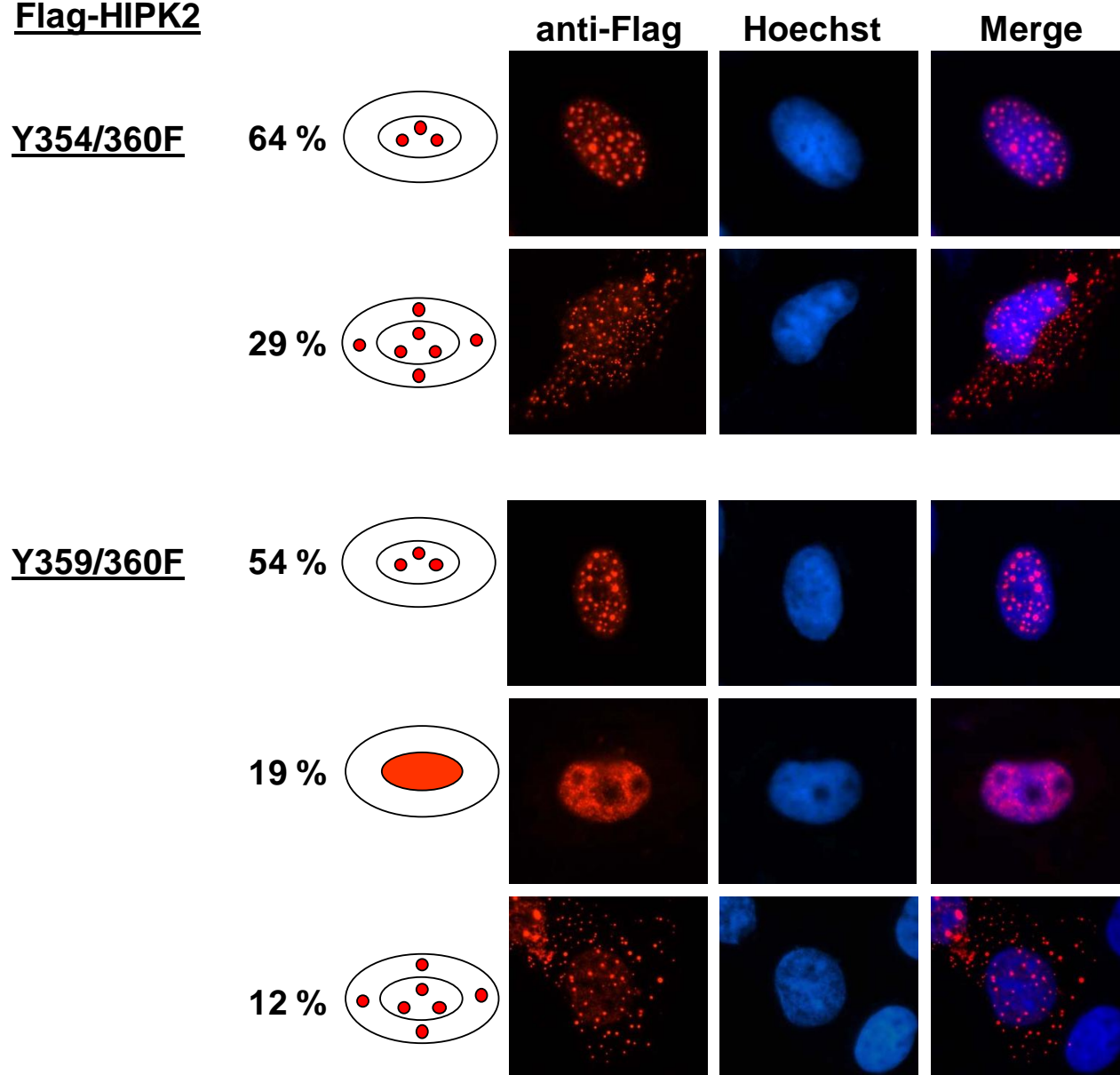
**Flag-HIPK2**

Abb. 3.2b: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Die gekennzeichneten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.

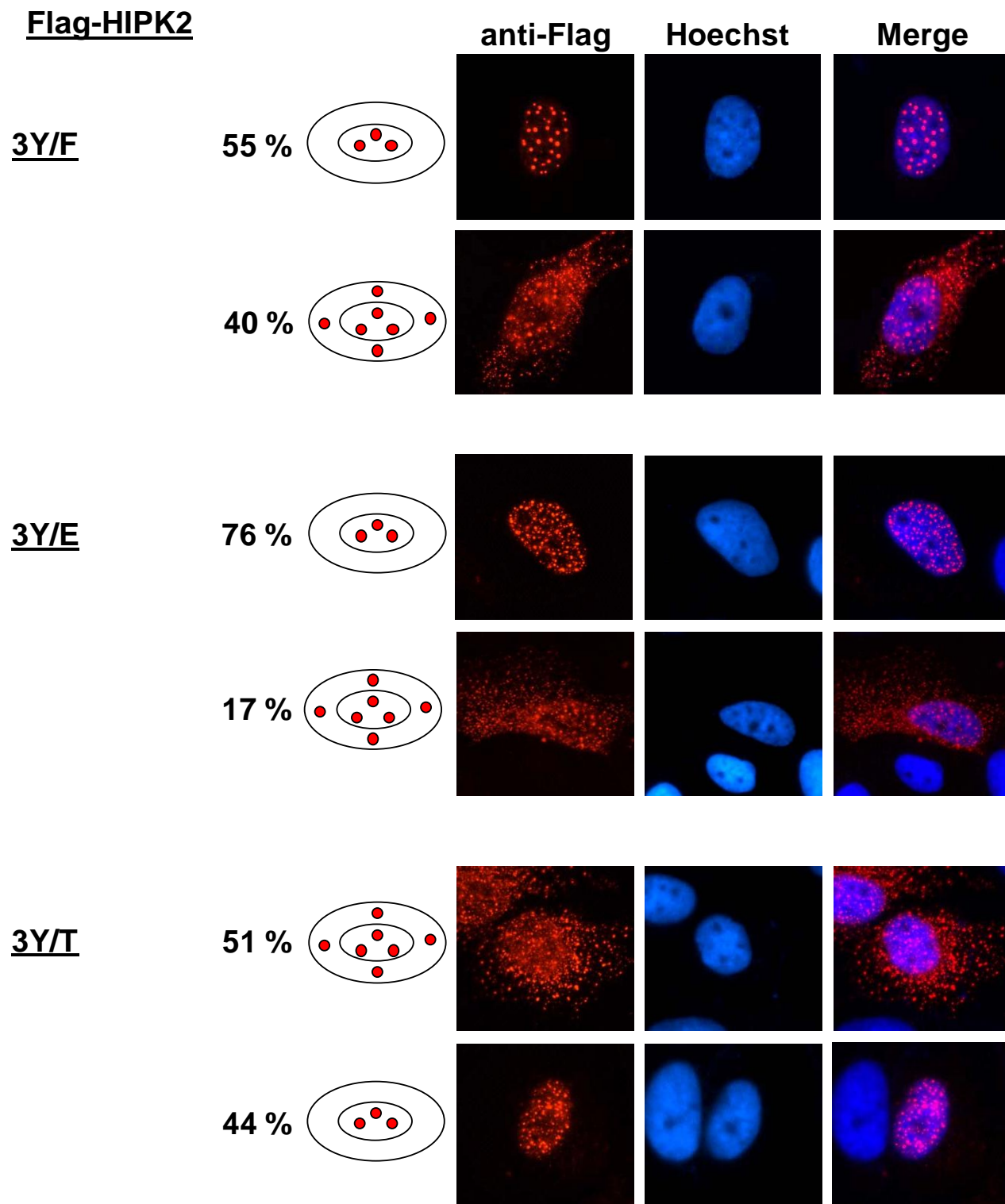


Abb. 3.2c: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Die gekennzeichneten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.

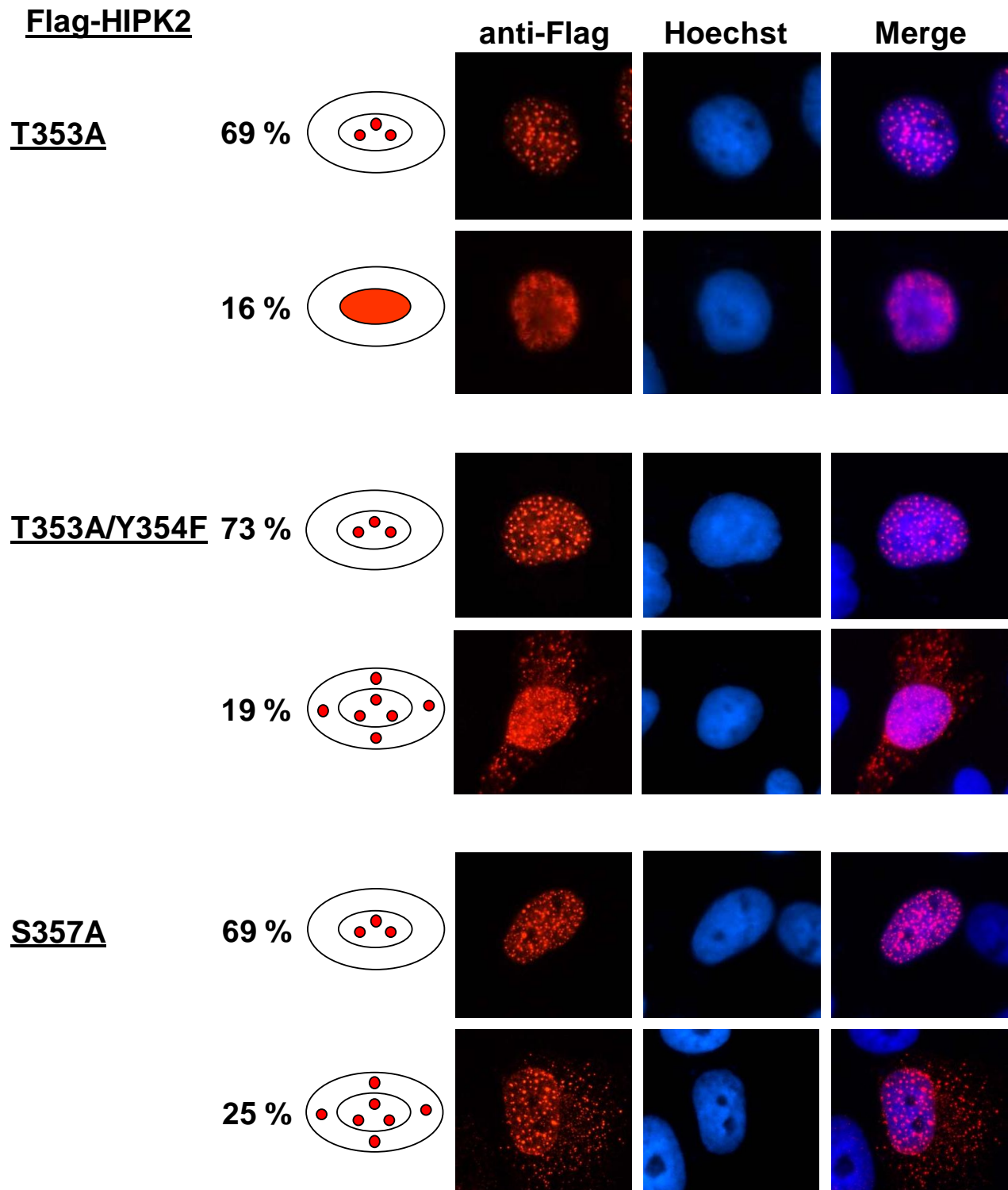


Abb. 3.2d: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Die gekennzeichneten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.

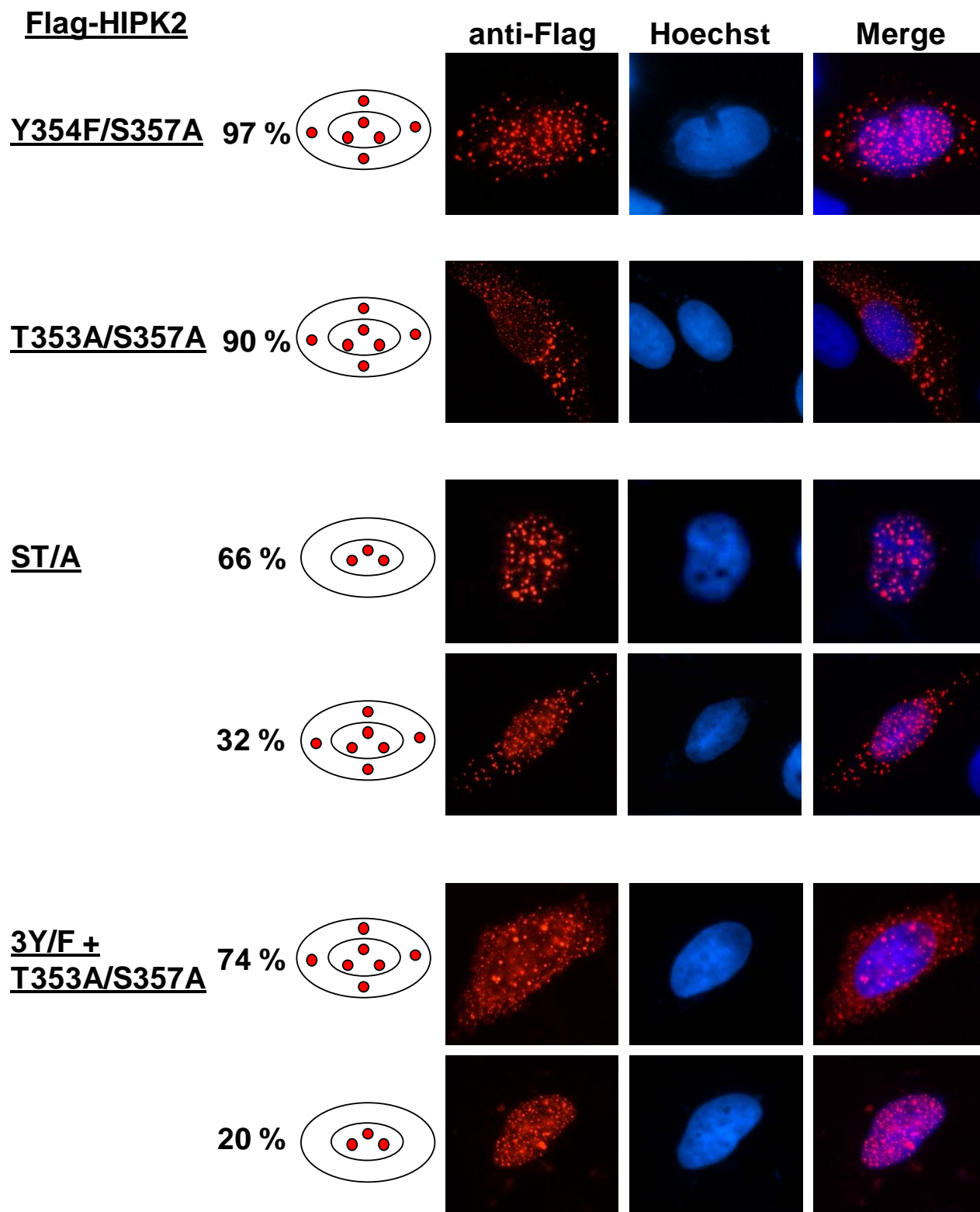


Abb. 3.2e: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Die gekennzeichneten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.

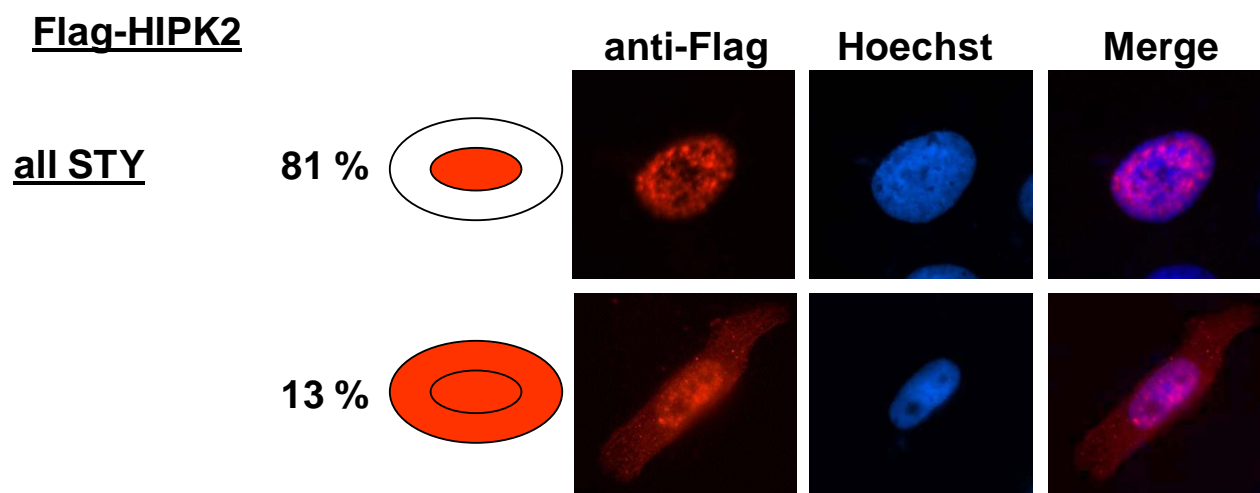


Abb. 3.2f: Phänotypen der einzelnen HIPK2-Konstrukte. Die gekennzeichneten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA in den Zellkernen wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die Anteile der dominierenden Phänotypen sind für jedes HIPK2-Konstrukt in Prozent angegeben.

Um einzelne wichtige HIPK2-Mutanten hervorzuheben, wird für diese die Verteilung der aufgetretenen Phänotypen in den folgenden Diagrammen gesondert aufgeführt (Abb. 3.3). Zu sehen sind fünf Kreisdiagramme im direkten Vergleich zueinander. In der oberen Reihe ist die Verteilung der aufgetretenen Phänotypen für den Wildtyp und die inaktive Punktmutante K221A dargestellt. Beim Wildtyp ist deutlich zu erkennen, dass 90 % der Zellen den Phänotyp 1 aufweisen, nur 9 % den Phänotyp 2 und 1 % den Phänotyp 3. Bei der inaktiven Punktmutante hingegen stellen sich 82 % der Zellen als Phänotyp 3 dar, 9 % als Phänotyp 1, 4 % als Phänotyp 4 und 2 % als Phänotyp 2. In der unteren Reihe sind zum Vergleich die 3Y/F-Mutante und die ST/A-Mutante aufgeführt. Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl bei der Mutation aller drei Tyrosine, also auch bei der Mutation der fünf Serine und des Threonins innerhalb der Aktivierungsschleife, bei beiden Mutanten immer noch über die Hälfte der Zellen den Phänotyp 1 aufweisen und der Phänotyp 2 als zweithäufigster erscheint. Damit tendieren diese beiden Mutanten von der Verteilung her eher zum Wildtyp als zu der inaktiven Punktmutante. Bei der allSTY-Mutante, die eine Mutation aller Tyrosine, Serine und Threonine innerhalb der Aktivierungsschleife beinhaltet, zeigt sich hingegen eine Verteilung, die der inaktiven Punktmutante ähnelt. Hier stellen sich 81 % der Zellen als Phänotyp 3 dar, 13 % als Phänotyp 4 und nur 5 % als Phänotyp 1. Der Phänotyp 2 mit weniger als 1 % kann vernachlässigt werden.

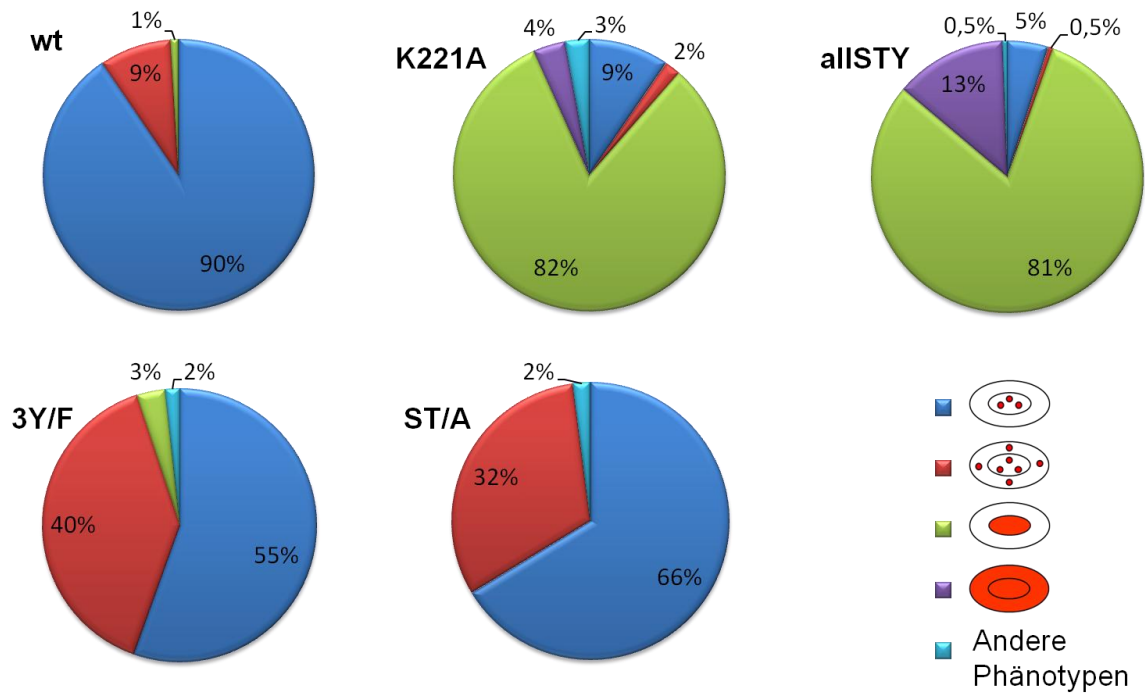


Abb. 3.3: Vergleichende Analyse der intrazellulären Lokalisation ausgewählter HIPK2-Konstrukte. Die gezeigten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS Zellen exprimiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die statistische Auswertung einiger Mutanten ist als Kreisdiagramme gezeigt. Abgebildet ist die intrazelluläre Verteilung von HIPK2-wt, HIPK2-K221A, HIPK2-allISTY, HIPK2-3Y/F und HIPK2-ST/A. Die dunkelblauen Felder zeigen den Anteil des Phänotyps 1, rot steht für Phänotyp 2, grün für Phänotyp 3, violett für Phänotyp 4 und hellblau zeigt den Anteil anderer Phänotypen. Es wurden 100 Zellen für jedes HIPK2-Konstrukt ausgewertet.

Um die Mutanten untereinander besser vergleichen zu können, erfolgt eine Darstellung von einzelnen zusammengefassten Gruppen in Säulendiagrammen. Der Wildtyp ist als Bezug jeweils mit aufgeführt. Die erste Gruppe bilden die Tyrosin-Mutanten (Abb. 3.4). Neben dem Wildtyp erscheint als erstes die Darstellung der Y354F-Mutante. Die Veränderungen gegenüber der Phänotyp-Verteilung des Wildtyps sind nur schwach. Anschließend ist die Mutante Y354/359F gezeigt. Diese weist eine Mutation der Tyrosine an Position 354 und 359 auf. Die Verteilung gegenüber dem Wildtyp zeigt sich hier etwas stärker verändert als bei der alleinigen Mutation des Tyrosins 354. Als nächstes dargestellt ist die Mutante Y354/360F, bei der die Tyrosine 354 und 360 gleichzeitig mutiert sind. Auch hier ist eine etwas stärkere Veränderung der Verteilung gegenüber dem Wildtyp erkennbar, als bei den beiden zuvor beschriebenen Mutanten. Nun erfolgt die Betrachtung der Y359/360F-Mutante, die also eine Mutation der Tyrosine 359 und 360 in Kombination beinhaltet. Die Verteilung der Phänotypen hier unterscheidet sich wiederum stärker vom Wildtyp, als bei den zuvor genannten Mutanten. Jedoch behält der Phänotyp 1 bei allen bis hierhin beschriebenen Mutanten die Mehrheit in der Verteilung. Bei den drei zuletzt gezeigten Mutanten sind jeweils alle drei Tyrosine der Aktivierungsschleife mutiert. Im ersten Fall befindet sich an deren Stelle jeweils ein Phenylalanin (F), im zweiten Fall ein Glutamat (E) und im dritten



Fall ein Threonin (T). Die Auswirkungen auf die Verteilung der Phänotypen sind beim Austausch der Tyrosine gegen Threonine am stärksten. Diese Mutante ist die einzige Tyrosin-Mutante, bei der der Phänotyp 1 nicht mehr die Mehrheit ausmacht, sondern der Phänotyp 2 mit 51 % überwiegt. Beim Austausch gegen Glutamat sind die geringsten Veränderungen zu sehen. Der Austausch gegen Phenylalanin sorgt für eine starke Verminderung des Phänotyps 1, jedoch behält er immer noch die Mehrheit in der Verteilung mit 56 % gegenüber dem Phänotyp 2 mit 40 %

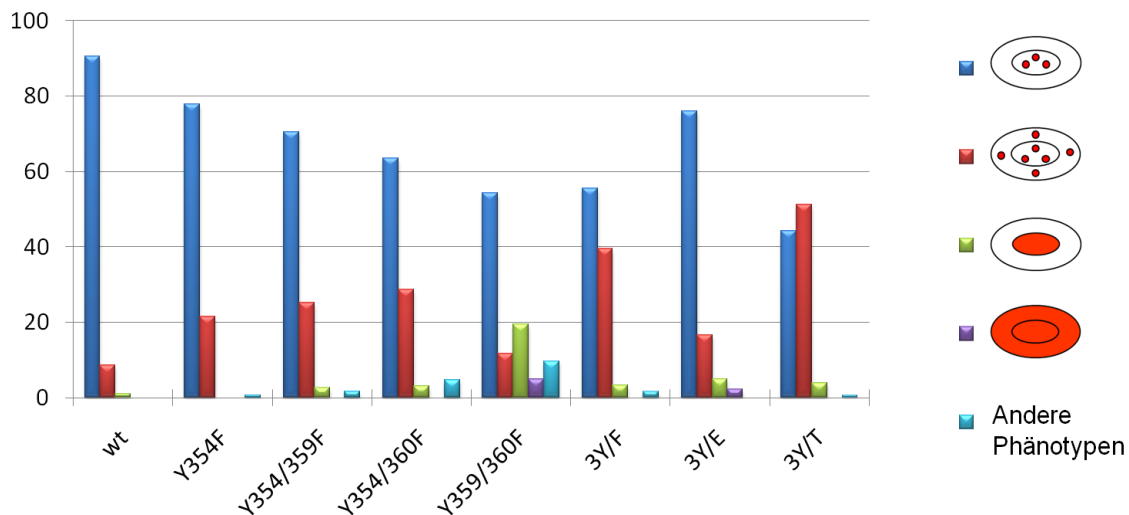


Abb. 3.4: Vergleichende Analyse der intrazellulären Lokalisation der Tyrosin-Mutanten. Die gezeigten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS Zellen exprimiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2-wt, HIPK2-Y354F, HIPK2-Y354/359F, HIPK2-Y354/360F, HIPK2-Y359/360F, HIPK2-3Y/F, HIPK2-3Y/E und HIPK2-3Y/T. Die unterschiedlichen Farben stehen wie gezeigt für die unterschiedlichen Phänotypen. Es wurden 100 Zellen für jedes HIPK2-Konstrukt ausgewertet.

Im direkten Vergleich der Threonin- und Serin-Mutanten zueinander ist nach dem Wildtyp zuerst die Mutante T353A gezeigt, bei der das Threonin an 353 gegen Alanin ausgetauscht wurde (Abb. 3.5). Leichte Veränderungen zum Wildtyp sind erkennbar, jedoch behält der Phänotyp 1 eindeutig die Mehrheit in der Verteilung mit 69 %. Bei der Kombination der Mutanten T353A und Y354F (T353A/Y354F) zeigt sich, verglichen zur alleinigen Mutation des Threonins 353, eine geringere Veränderung zum Wildtyp. Die Mutante S357A weist ebenfalls keine sehr starken Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf. Der Phänotyp 2 hat, wie auch bei der Mutante T353A/Y354F, leicht zugenommen, jedoch bestimmt der Phänotyp 1 mit 70 % nach wie vor das Verteilungsbild. Im Anschluss sind die Mutanten Y354F/S357A und T353A/S357A gezeigt. Bei beiden überwiegt der Anteil des Phänotyps 2 mit 97 % bzw. 90 %. In der Kombination der

Mutation aller fünf Serine und des Threonins (ST/A) hingegen zeigt sich wieder der Phänotyp 1 in der Mehrheit mit 68 %, während der Phänotyp 2 nur 32 % der Verteilung ausmacht.

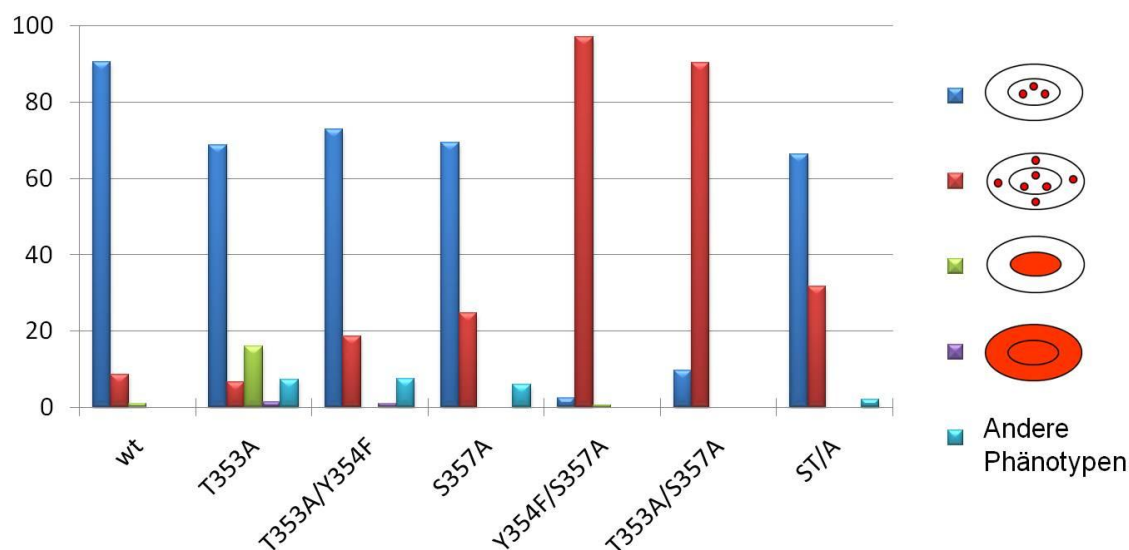


Abb. 3.5: Vergleichende Analyse der intrazellulären Lokalisation der in Threoninen und/oder Serinen mutierten HIPK2-Versionen. Die gezeigten HIPK2-Mutanten wurden in U2OS Zellen exprimiert, mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert und sind im Säulendiagramm dargestellt. Die unterschiedlichen Farben stehen wie gezeigt für die unterschiedlichen Phänotypen. Es wurden 100 Zellen für jedes HIPK2-Konstrukt ausgewertet.

Als letztes werden die HIPK2-Konstrukte gezeigt, die multiplen Mutationen unterzogen wurden (3.6). Im nachfolgenden Diagramm ist erneut der Wildtyp und zusätzlich auch die inaktive Punktmutante K221A mit aufgeführt. Darauf folgt die Darstellung der Mutante 3Y/F+TS, bei der eine Mutation aller drei Tyrosine zu Phenylalanin und des Threonins 353 und des Serins 357 zu Alanin vorliegt. Es zeigt sich deutlich, wie stark die Phänotyp-Verteilung hier von der des Wildtyps abweicht. 74 % aller Zellen zeigen den Phänotyp 2 und nur noch 20 % weisen Phänotyp 1 auf. Daneben ist das HIPK2-Konstrukt allSTY gezeigt. Hier liegen die Mutationen aller Serine, Threonine und Tyrosine der Aktivierungsschleife gemeinsam vor. Der Phänotyp 3 dominiert mit 81 % das Erscheinungsbild der Zellen. Die starke Annäherung zur Verteilung der inaktiven Punktmutante ist gut zu sehen. Zusätzlich erscheinen 13 % der Zellen als Phänotyp 4 während, nur noch 5 % der Zellen den Phänotyp 1 darstellen.



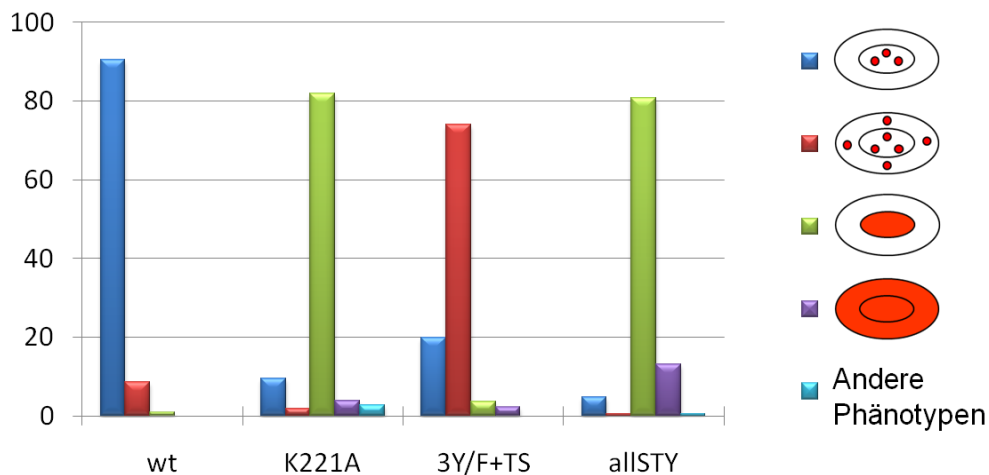


Abb. 3.6: Vergleichende Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2-wt, HIPK2-K221A, HIPK2-3Y/F+TS und HIPK2-allISTY. Die gezeigten HIPK2 Konstrukte wurden in U2OS Zellen exprimiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die statistische Auswertung für alle Konstrukte ist im Säulendiagramm gezeigt. Die unterschiedlichen Farben stehen wie gezeigt für die unterschiedlichen Phänotypen. Es wurden 100 Zellen für jedes HIPK2-Konstrukt ausgewertet.

### 3.2.4 Beeinflussung der Größe, Form und Verteilung der Speckles durch Mutationen in der Aktivierungsschleife von HIPK2

Auffällig bei der Auswertung war, dass die Größe der Speckles in den einzelnen Zellen zum Teil sehr unterschiedlich ausfallen konnte. Des Weiteren kamen sowohl exakt runde Formen mit klarer Abgrenzung zur Umgebung als auch ovale Formen oder solche mit leicht verschwommenen oder ausgefranst Grenzen vor. Zudem erschien die Verteilung der Speckles im Kern manchmal nicht ganz zufällig, sodass die Vermutung aufkam, dass bei den einzelnen HIPK2-Mutanten Unterschiede bezüglich dieser Kriterien bestehen könnten. Zunächst wurden die Speckles bezüglich ihrer Größe beurteilt. Die großen Speckles traten markant hervor und hatten eine symmetrische Form. Bei den kleinen Speckles handelte es sich um sehr kleine und fein verteilte Pünktchen. Hier war oft bereits ein Übergang zur diffusen Verteilung im Kern vorhanden. Die Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft Fotos von Zellen mit auffallend großen und kleinen Speckles.

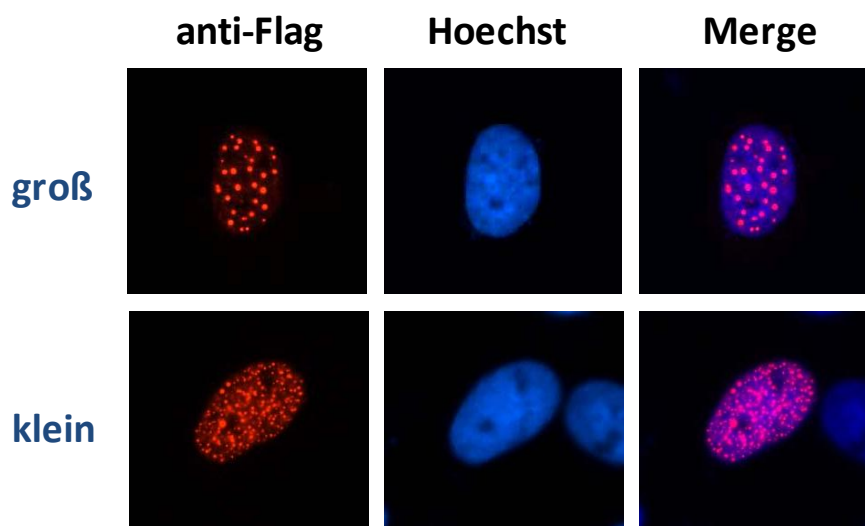


Abb. 3.7: Einteilung der Speckle-Größe von HIPK2. Flag-HIPK2 wurde in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem Primärantikörper (anti-Flag M2) und dem entsprechenden Sekundärantikörper anti-Maus IgG Cy3 angefärbt. HIPK2 ist rot dargestellt und die DNA der Zellkerne wurde mit Hoechst blau angefärbt. Rechts ist die Überlagerung beider Bilder gezeigt. Die obere Reihe zeigt beispielhaft Speckles, die als groß klassifiziert wurden und in der unteren Reihe sind typische kleine Speckles abgebildet.

Auch hier wurden immer mindestens 100 Zellen jeder Mutante ausgezählt. Hierzu wurden die bereits vorhandenen Deckgläschen verwendet, mit denen auch der Phänotyp bestimmt wurde. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HIPK2-Mutanten bezüglich der drei oben genannten Kriterien. Den Hauptteil machten immer die normal großen Speckles mit mindestens 90 % aus. Bei allen Mutanten traten Speckles unterschiedlicher Form auf und es kamen immer wieder auffällige Verteilungen im Kern vor, jedoch erschienen diese Merkmale so vereinzelt, dass sie für keine HIPK2-Mutante als charakteristisch angesehen werden konnten.

### 3.3 Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 in Abhängigkeit vom Zellzyklus

#### 3.3.1 Thymidin/Aphidicolin Synchronisation

Der Erfolg der Synchronisationsmethode mittels Thymidin und Aphidicolin wurde mittels Western blotting und FACS-Analyse überprüft. Als erstes ist hier die Überprüfung mittels Western blotting beschrieben. Der Ablauf des Zellzyklus eukaryontischer Zellen und die Bedeutung der Cycline für diesen sind unter 1.3 erläutert worden. Wie oben beschrieben steigt die Konzentration der einzelnen Cycline während des Zellzyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten an und fällt dann wieder ab. Diese Eigenschaft kann man sich zu Nutzen machen, um mittels Western

blotting die Zellzyklusphase zu bestimmen, in der sich Zellen gerade befinden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen synchronisiert (2.8.3). Das Augenmerk liegt in diesem Experiment auf dem Cyclin B1. Der Westernblot zeigt die Cyclin B1-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 h, als die Zellen frisch synchronisiert waren, sowie 3 h, 8 h und 12 h nach Beendigung der Synchronisation (Abb. 3.8). Wie unter 2.8.3 erklärt, bewirken Thymidin und Aphidicolin, dass die Zellen während ihres Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase gestoppt werden. Also befinden sich die Zellen zum Zeitpunkt 0 h am Beginn der S-Phase. Die Menge an Cyclin im Westernblot steigt kontinuierlich an, bis sie ihren Höhepunkt nach 8 h, also am Ende der G2-Phase, hat. Nach 12 h ist die Konzentration bereits stark abgefallen. Die Zellen befinden sich hier in der M-Phase, in der die Konzentration des Cyclins B1 schließlich wieder bis auf null absinkt. Somit zeigt der Westernblot, dass die Synchronisation der HeLa-Zellen mittels Thymidin und Aphidicolin erfolgreich durchgeführt wurde.

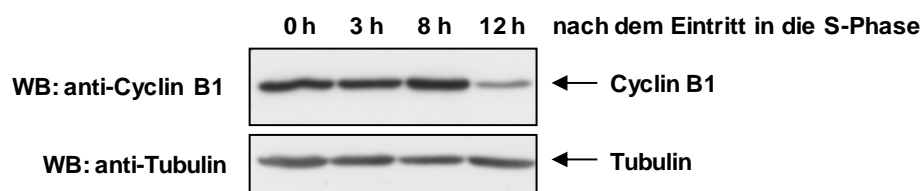
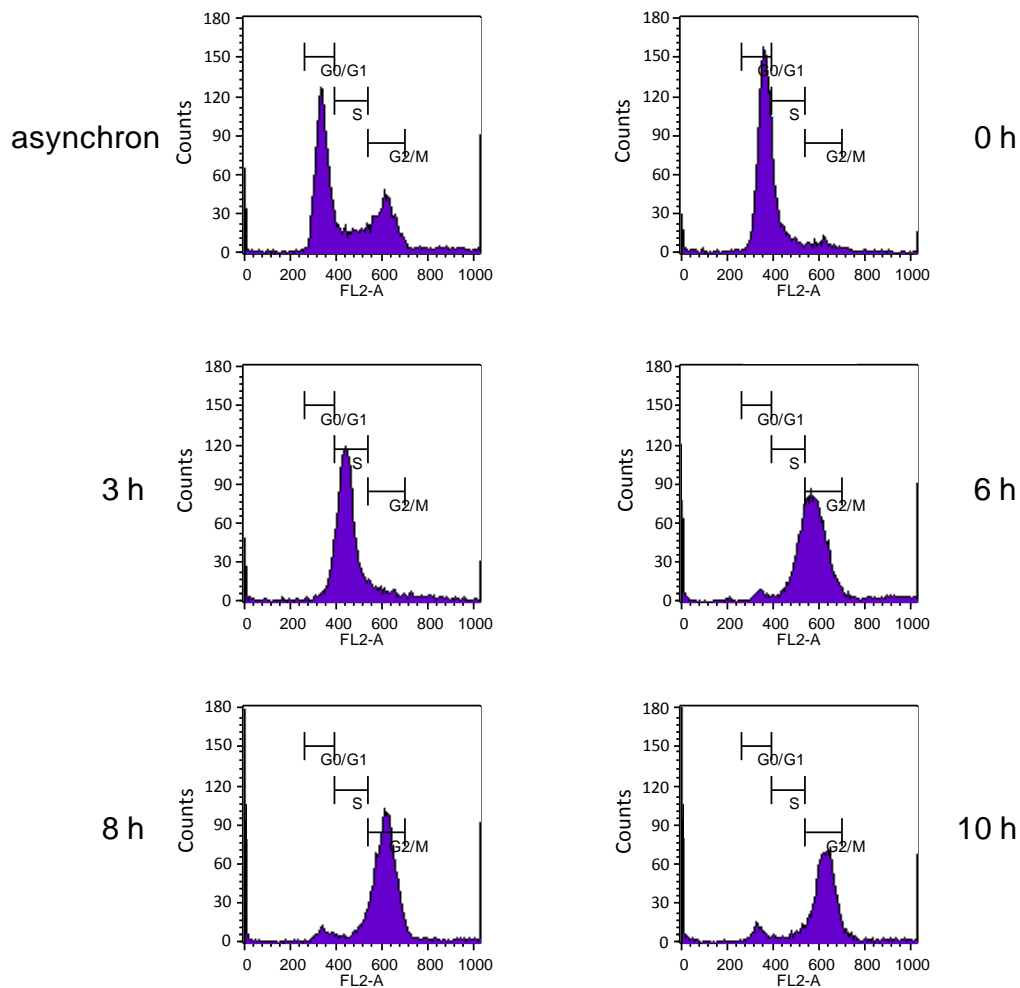


Abb. 3.8: Analyse der Cyclin B1 Menge im Zellzyklus. HeLa-Zellen wurden mittels Thymidin und Aphidicolin am G1/S-Übergang arretiert. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde für die angegebenen Zeiträume und Zellextrakte mittels Westernblot auf die Expression von Cyclin B1 und der Ladekontrolle Tubulin analysiert.

Eine weitere Methode um den Erfolg der Synchronisation zu kontrollieren ist die unter 2.8.4 beschriebene Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die HeLa-Zellen wieder synchronisiert (2.8.3) und 0 h, 3 h, 6 h, 8 h und 10 h nach der Synchronisation fixiert, um dann ihren DNA-Gehalt mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine Probe mit asynchronen Zellen gemessen. Die nachfolgenden Diagramme bestätigen, dass die Synchronisation erfolgreich durchgeführt wurde (Abb. 3.9). Auf der X-Achse (FL2-A) der Diagramme wird die Menge an vorhandener DNA vermerkt, während die Y-Achse (Counts) die Anzahl der Zellen dokumentiert. Das erste Histogramm zeigt den asynchronen Zellsatz und die natürliche Verteilung der Zellen im Zellzyklus mit dem Hauptanteil in der G0- / G1-Phase. In den weiteren Histogrammen ist die Verteilung zu den verschiedenen Stopp-Zeitpunkten dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich direkt nach der Synchronisation fast alle Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase befinden und im weiteren Verlauf relativ synchron die folgenden Phasen durchlaufen, bis sie 10 h nach der Synchronisation wieder breiter gefächert in den einzelnen Stadien verteilt sind.



### Mengenanteil der Zellen in den einzelnen Phasen in Prozent (%)

	A	G0 / G1	S	G2 / M
asynchron	0,66	53,44	15,54	25,13
0 h	0,90	75,33	18,22	4,77
3 h	1,00	9,25	78,82	6,60
6 h	0,89	2,85	32,67	56,69
8 h	1,41	3,75	11,28	76,69
10 h	2,05	6,86	7,08	74,41

Abb. 3.9: FACS-Analyse der Zellzyklusphasen synchronisierter HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mittels Thymidin und Aphidicolin synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Synchronisation fixiert. Die DNA wurde mittels Propidiumjodid angefärbt, der DNA-Gehalt der Zellen gemessen und anhand dessen konnte bestimmt werden in welcher Zellzyklusphase sich diese befinden. Die x-Achse zeigt die Intensität der DNA-Färbung, welche der DNA-Menge entspricht und die y-Achse gibt die Anzahl der Zellen an. Gezeigt sind asynchron wachsende Zellen sowie Zellen, die arretiert waren (0 h) bzw. für die gezeigten Zeiträume proliferieren konnten. Zusätzlich ist eine Tabelle angegeben, welche in Prozent angibt, wie die Mengenanteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sind.

### 3.3.2 Erfolgreiche Synchronisation der HeLa-Fucci-Zellen

Die unter 2.4.2 aufgeführte humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa-Fucci hat eine besondere Eigenschaft. Die Zellkerne dieser Zellen leuchten unter Fluoreszenzlicht betrachtet während der G1-Phase rot und während der S-Phase grün. Fucci steht für *fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indication* und basiert auf der Zellzyklus-abhängigen Proteolyse der Proteine Geminin und Cdt1 [92]. Diese beiden Proteine sind unter anderem im Zellzyklus für das Voranschreiten in den unterschiedlichen Phasen verantwortlich. Bekannt war, dass die Proteinkonzentrationen von Geminin und Cdt1 während des Zellzyklus gegenphasig schwanken. Mittels Westernblot wurde nachgewiesen, dass Cdt1 seine maximale Konzentration in der G1-Phase erreicht, während Geminin das höchste Level in der S-, G2- und M-Phase erlangt [93]. Die beiden Proteine wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen mKO2 (*monomeric version of Kusabira Orange 2*) und mAG (*monomeric version of Azami Green*) fusioniert. Die so konzipierten Konstrukte mKO2-Cdt1(30/120) und mAG-hGem(1/110) wurden in HeLa-Zellen transfiziert, sodass die hier verwendeten HeLa-Fucci-Zellen entstanden. Durch die Stabilisierung von mKO2-Cdt1(30/120) während der G1-Phase und der gleichzeitigen Ubiquitin-vermittelten Proteolyse von mAG-hGem(1/110) leuchten die Zellkerne in dieser Phase rot. Am Übergang von der G1- zur S-Phase sind kurzfristig beide Konstrukte in geringem Maße noch bzw. schon stabil, sodass sich für die Zellkerne ein temporär gelber Farbton ergibt. In der S-Phase ist mKO2-Cdt1(30/120) dann vollständig abgebaut und mAG-hGem(1/110) ist stabil. Dieser Zustand hält über die G2- und M-Phase an, sodass die Zellkerne in diesem gesamten Abschnitt grün leuchten. Am Übergang von der M- zur G1-Phase erlischt das Fluoreszenzsignal dann kurzzeitig, da hier beide Konstrukte abgebaut sind [92].

Die Synchronisation der HeLa-Fucci-Zellen erfolgte auch hier wieder mittels Thymidin und Aphidicolin (2.8.3). Die Zellen wurden auf ihren Deckgläschen 0 h, 3 h, 8 h und 11 h nach erfolgter Synchronisation mittels Paraformaldehyd und Triton X-100 fixiert (2.9.1.3) und auf Objektträger überführt. Zusätzlich wurde ein Deckgläschen mit asynchronen Zellen fixiert. Die nachfolgenden Fotos zeigen die Darstellung unter dem Mikroskop zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 3.10). Die erste Bildserie zeigt die asynchronen Zellen, deren Zellkerne hauptsächlich rot leuchten, da sich die meisten in der G1-Phase befinden. Die weiteren Bilder zeigen die Farbverteilung der Zellkerne zu den oben genannten Stopp-Zeitpunkten. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Zellen nach erfolgter Synchronisation gemeinsam in die S-Phase eingetreten sind, da die Zellkerne hier grün leuchten. Nach 11h ist dann für viele Zellen der Übergang von der M- zur G1-Phase erfolgt. Der Anteil roter Zellkerne nimmt hier merklich zu. Somit ist gezeigt, dass das hier verwendete Synchronisationsprotokoll auch für die HeLa-Fucci-Zellen erfolgreich

eingesetzt werden kann.

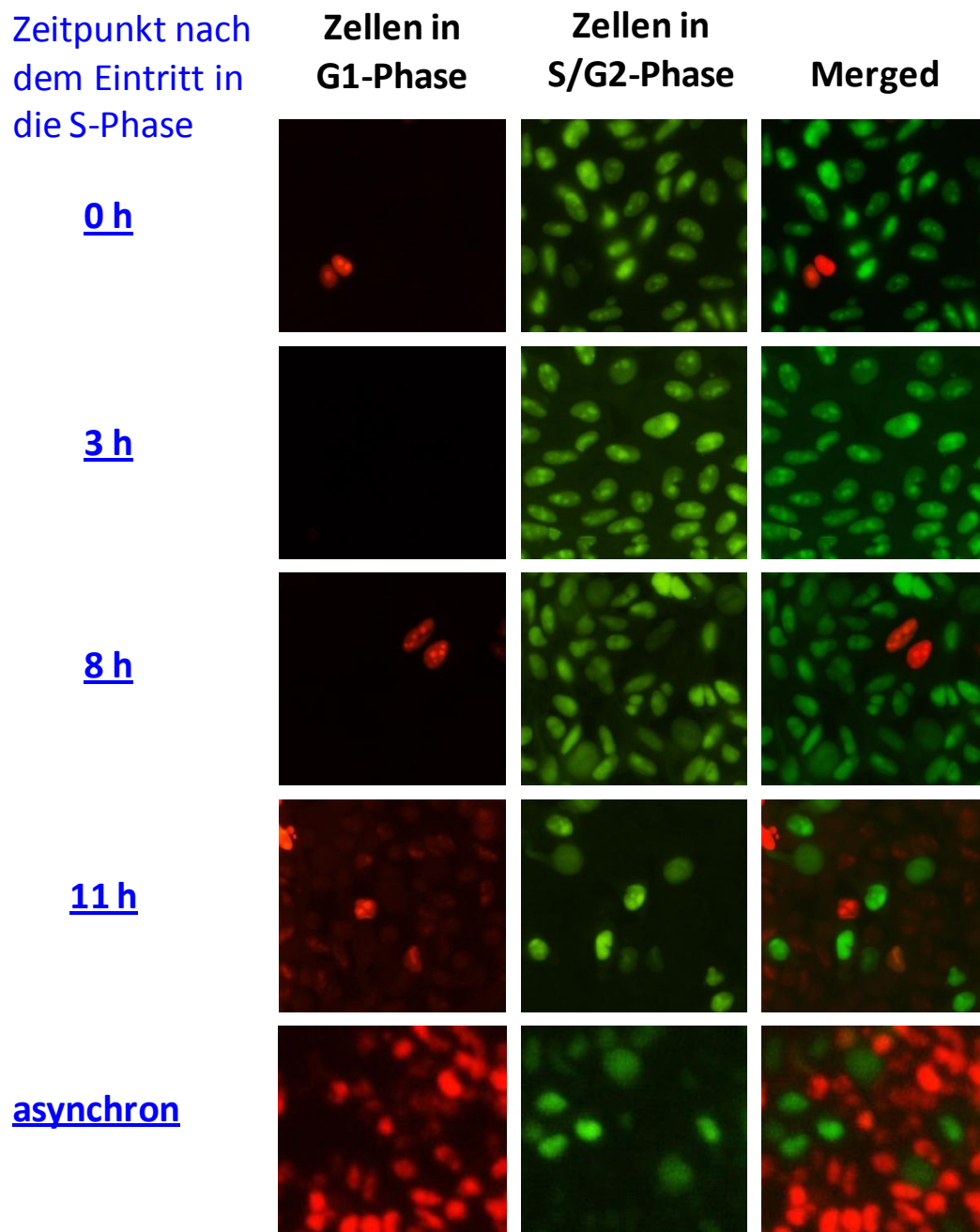


Abb. 3.10: Zellzyklusanalyse der HeLa-Fucci-Zellen. HeLa-Fucci-Zellen wurden mittels Thymidin und Aphidicolin am G1 / S-Übergang arretiert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Synchronisation fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In der ersten Spalte sind die Zellen der G1-Phase gezeigt, welche unter Fluoreszenzlicht rot leuchten, die zweite Spalte zeigt die grün leuchtenden Zellen der S- und G2-Phase und in der letzten Spalte ist die Überlagerung der beiden ersten Fotos zu sehen. Die Fotos sind 0 h, 3 h, 6 h, 8 h und 10 h nach erfolgter Synchronisation entstanden. Zusätzlich ist eine Fotoserie eines asynchronen Zellsatzes gezeigt.

### 3.3.3 Die Lokalisation der überexprimierten HIPK2 in eukaryontischen Zellen in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Für diese Versuchsreihe wurden ausgewählte HIPK2-Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert, welche zuvor auf Deckgläschen kultiviert wurden. Die Zellen wurden synchronisiert und im Abstand 0 h, 3 h, 6 h, 8 h und 10 h nach der Synchronisation fixiert. Die überexprimierten HIPK2-Mutanten wurden mittels Antikörperfärbung mit anti-Flag (M2) (1:5000) und anti-Maus IgG Cy3 (1:10000) sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop, wobei zwischen 60 und 100 Zellen pro Mutante und Zeitpunkt ausgezählt wurden und den unter 3.2.1 beschriebenen Phänotypen zugeordnet wurden.

Die intrazelluläre HIPK2-Verteilung des Wildtyps zeigt im Laufe des Zellzyklus eine unterschiedliche Verteilung. Bei den synchronisierten HeLa-Zellen ist direkt nach der Synchronisation (0 h) der Phänotyp 1, bei dem sich fast ausschließlich Speckles im Kern befinden, mit 94 % vertreten und nimmt bis zum Zeitpunkt 8 h kontinuierlich ab bis auf 70 %. Zum Zeitpunkt 10 h ist sein Vorkommen wieder auf 75 % angestiegen. Gegensätzlich verhält sich der Phänotyp 3, bei dem HIPK2 diffus im Kernplasma vorliegt. Zum Zeitpunkt 0 h liegt seine Häufigkeit bei knapp 4 %, während er nach 8 h 26 % ausmacht. Der Phänotyp 2, mit Speckles im Kern und Zytoplasma, ist mit einer Häufigkeit zwischen 1 und 4 % über den gesamten Zeitraum nicht signifikant. Zum Vergleich ist die Verteilung der Phänotypen bei asynchronen Zellen gezeigt (Abb. 3.11). Der Phänotyp 4, bei dem sich HIPK2 diffus im Kern und Zytoplasma verteilt, erscheint hier zu keinem Zeitpunkt.

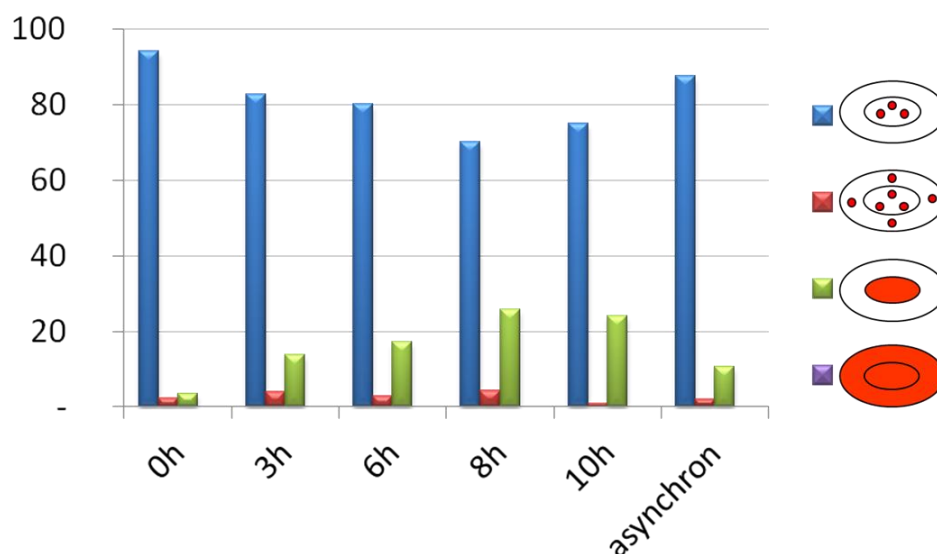


Abb. 3.11: Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2-wt in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HIPK2-wt wurde in

HeLa-Zellen transfiziert und nach Färbung mit adäquaten Antikörpern bezüglich seiner intrazellulären Lokalisation untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die intrazelluläre Verteilung der HIPK2 0, 3, 6, 8 und 10 h nach erfolgter Synchronisation. Zusätzlich ist ein asynchroner Zellsatz dargestellt.

Ein Blick auf die Mutante HIPK2-Y354F zeigt, dass der Zeitpunkt 8 h auch hier eine merkliche Veränderung in der Verteilung der Phänotypen hervorruft, ähnlich wie beim Wildtyp. Der Phänotyp 1 sinkt von 68 % zum Zeitpunkt 0 h auf sein Minimum von 48 % nach 8 h ab. Gegenläufig verhält sich hierzu der Phänotyp 2, der sein Minimum mit 31 % zum Zeitpunkt 0 h aufweist und sein Maximum nach 8 h mit 53 % erreicht (Abb. 3.12). Der Phänotyp 3 ist hier aufgrund seiner geringen Prozentzahlen zu vernachlässigen, während der Phänotyp 4 bei dieser Mutante gar nicht auftritt.

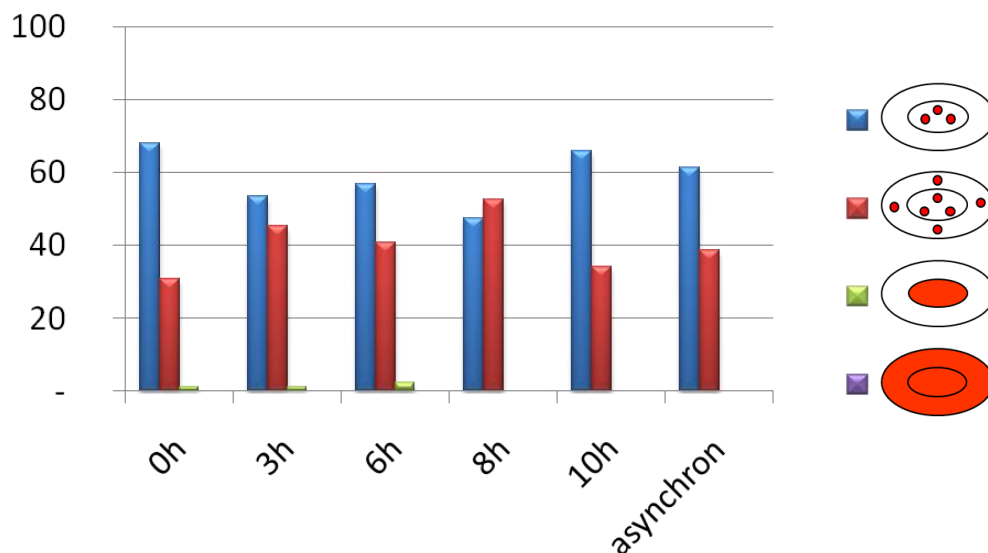


Abb. 3.12: Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2-Y354F in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HIPK2-Y354F wurde in HeLa-Zellen transfiziert und nach Färbung mit adäquaten Antikörpern bezüglich seiner intrazellulären Lokalisation untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die intrazelluläre Verteilung der HIPK2 0, 3, 6, 8 und 10 h nach erfolgter Synchronisation. Zusätzlich ist ein asynchroner Zellsatz dargestellt.

Die Mutante HIPK2-Y359/360F zeigt eine grundlegend andere Verteilung der Phänotypen als die beiden zuvor beschriebenen Konstrukte. Jedoch ist auch hier der Zeitpunkt 8 h nach erfolgter Synchronisation, wie bereits bei den beiden vorangegangenen HIPK2-Konstrukten, ein Zeitpunkt, an dem die Verteilung ihre extremste Veränderungen verglichen zum Zeitpunkt 0 h zeigt. Beim HIPK2-Y359/360F nimmt die Anzahl des Phänotyps 1 im Verlauf zu und erreicht bei 8 h ihr Maximum mit 61 % während sie zum Zeitpunkt 0 h bei 46 % liegt. Stattdessen sinkt der



Phänotyp 3 bei dieser Mutante von anfangs 27 % auf 13 % zum Zeitpunkt 8 h ab. Der Phänotyp 2 schwankt in seiner Häufigkeit zwischen 18 und 30 %, zeigt aber keine Regelmäßigkeit bezüglich der Ab- und Zunahme. HIPK2-Y359/360F ist die einzige Mutante, bei der der Phänotyp 4 zu jedem Zeitpunkt vertreten ist. Er hat sein Maximum zum Zeitpunkt 0 h mit 4 % und mit 1 % zum Zeitpunkt 8 h sein Minimum, ist aber aufgrund des geringen Anteils an der Gesamtverteilung der Zellen zu vernachlässigen (Abb. 3.13).

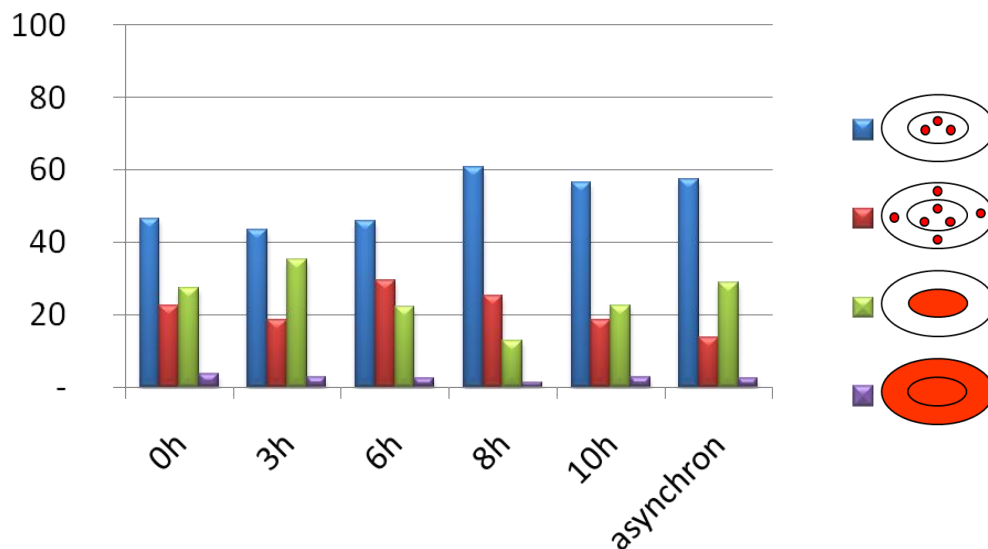


Abb. 3.13: Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2-Y359/360F in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HIPK2-Y359/360F wurde in HeLa-Zellen transfiziert und nach Färbung mit adäquaten Antikörpern bezüglich seiner intrazellulären Lokalisation untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die intrazelluläre Verteilung der HIPK2 0, 3, 6, 8 und 10 h nach erfolgter Synchronisation. Zusätzlich ist ein asynchroner Zellsatz dargestellt.

Bei der Mutante HIPK2-3Y/F scheint der Zeitpunkt 8 h nicht wie bei allen bisher betrachteten Konstrukten eine relevante Veränderung hervorzurufen. Hingegen zeigt sich hier die deutlichste Änderung bei der Verteilung der Phänotypen 3 h nach Beendigung der Synchronisation. Während der Phänotyp 1 zu allen anderen Messpunkten einen Anteil von ungefähr 60 % hat, sinkt er zum Zeitpunkt 3 h auf 33 % ab. Hingegen vertritt der Phänotyp 2 stets zwischen 36 und 38 %, schnellst aber nach 3 h auf 63 % hoch. Der Phänotyp 3 spielt bei dieser Mutante eine untergeordnete Rolle, da die Häufigkeit nie über 5 % ansteigt. Der Phänotyp 4 tritt hier zu keinem Zeitpunkt auf (Abb. 3.14).

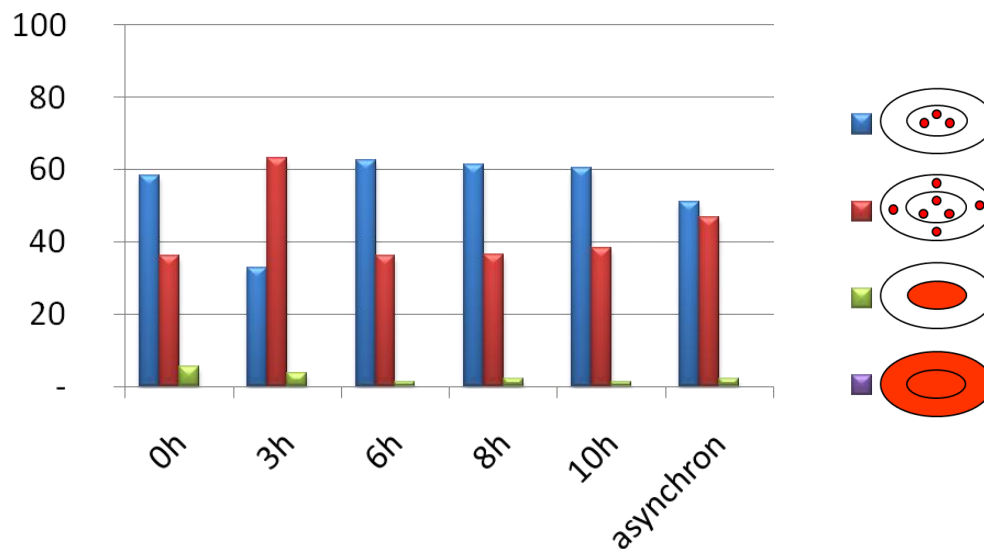


Abb. 3.14: Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2-3Y/F in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HIPK2-3Y/F wurde in HeLa-Zellen transfiziert und nach Färbung mit adäquaten Antikörpern bezüglich seiner intrazellulären Lokalisation untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die intrazelluläre Verteilung der HIPK2 0, 3, 6, 8 und 10 h nach erfolgter Synchronisation. Zusätzlich ist ein asynchroner Zellsatz dargestellt.

Als letztes wurde die Mutante HIPK2-T353A betrachtet. Diese ist von besonderem Interesse, da sie in der Datenbank *Phosida* ([www.phosida.com](http://www.phosida.com)) als Zellzyklus-reguliert beschrieben wird. In den hier synchronisierten HeLa-Zellen ist, bezogen auf die intrazelluläre Lokalisation der HIPK2-T353A-Mutanten, eine ähnliche Verteilung wie beim HIPK2-Wildtyp zu erkennen. Auch hier steigt die Häufigkeit des Phänotyps 3 an und erreicht bei 8 h ihr Maximum mit 20 %. Zum Zeitpunkt 0 h lag die Häufigkeit bei 7 %. Gegenläufig verhält sich auch hier der Phänotyp 1, der bei 0 h sein Maximum mit 90 % hat und zum Zeitpunkt 8 h bis auf 76 % abfällt. Der Phänotyp 2, der Speckles im Kern und Zytoplasma aufweist, schwankt in der Häufigkeit seines Auftretens zwischen 2 und 9 %, verfolgt jedoch kein aussagekräftiges Muster. Der Phänotyp 4, bei dem HIPK2 im Kern- und Zytoplasma diffus verteilt auftritt, erscheint hier mit 2 % nur einmal nach 8 h (Abb. 3.15).

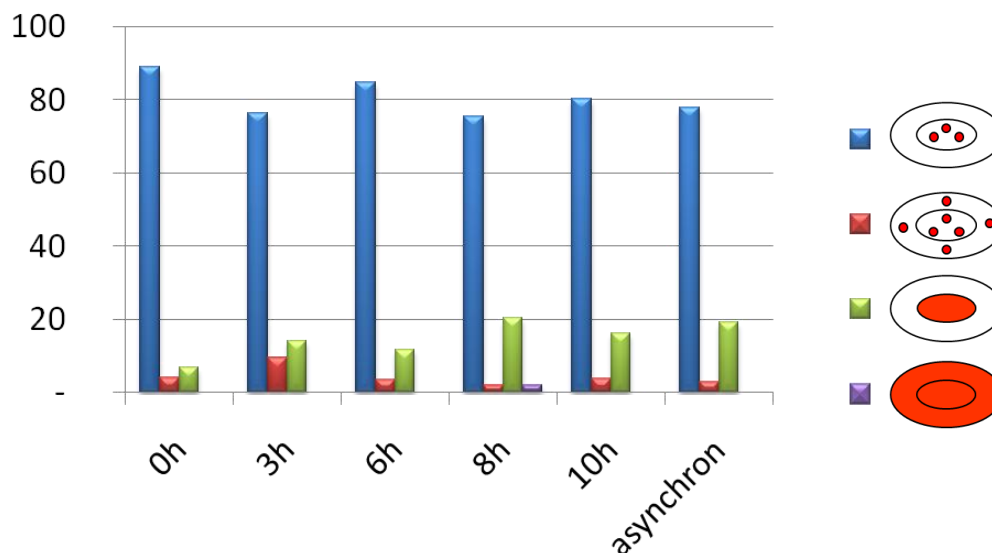


Abb. 3.15: Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2-T353A in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HIPK2-T353A wurde in HeLa-Zellen transfiziert und nach Färbung mit adäquaten Antikörpern bezüglich seiner intrazellulären Lokalisation untersucht. Das Säulendiagramm zeigt die intrazelluläre Verteilung der HIPK2 0, 3, 6, 8 und 10 h nach erfolgter Synchronisation. Zusätzlich ist ein asynchroner Zellsatz dargestellt.

Somit ist abgesehen von der Mutante HIPK2-3Y/F bei allen hier getesteten Konstrukten der Zeitpunkt 8 h nach der Synchronisation durch eine merkliche Veränderung in der Verteilung der Phänotypen aufgefallen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die meisten Zellen in der G2- oder M-Phase und es gab eine signifikante Verschiebung der Häufigkeiten verglichen mit der S-Phase zum Zeitpunkt 0 h. Demnach scheint ein gewisser Einfluss des Zellzyklus auf die intrazelluläre Verteilung der auftretenden Phänotypen zu existieren, wobei vier der hier verwendeten Konstrukte 8 h nach der Synchronisation die stärkste Veränderung aufweisen und nur bei HIPK2-3Y/F diese bereits nach 3 h auftritt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der endogenen HIPK2

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung nuklearer Kompartimente werden in der Literatur verschiedene Methoden zur Fixierung eukaryontischer Zellen beschrieben. Die am häufigsten genannten Fixierungen sind Methanol / Aceton (1:1) [15, 32], 100 % Methanol [94, 95] und Paraformaldehyd in unterschiedlichen Konzentrationen [94, 96, 97]. Welche dieser Methoden am geeignetsten ist, um die endogene HIPK2 mittels Immunofluoreszenz darzustellen, und welcher Antikörper am effektivsten ist, wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht. Es ergab sich, dass die Fixierung mit 4 %igem PFA das klarste Bild zeigte und am wenigsten Hintergrundrauschen aufwies. Die notwendige Permeabilisierung der Zellwand wurde am effektivsten mit 0,1 %igem und 0,3 %igem Triton X-100 durchgeführt. Nach Identifizierung der optimalen Fixierungsmethode erfolgte die Analyse der Primär- und Sekundärantikörper. Die besten Ergebnisse wurden mit den Primärantikörpern  $\Delta C$  K 121 und  $\Delta C$  K 442 (1:1500 bis 1:4000) in Kombination mit dem Sekundärantikörper anti-Mehrschwein IgG Cy3 (1:1500) erzielt. Hierbei zeigten sich Zellen in deren Kernen fluoreszierende Pünktchen auszumachen waren. Allerdings wiesen nicht alle Zellen diese Speckles auf und das Signal war zudem sehr schwach. Es lässt sich also nur vermuten, dass es sich hier um spezifisch angefärbte endogene HIPK2 handelt. Hofmann et al. zeigten 2002 die endogene HIPK2 in U2OS-Zellen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 5-minütige Inkubation in Methanol / Aceton (1:1) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [32]. Die in dieser Arbeit für diese Versuchsreihe verwendeten A-549-Zellen zeigen naturgemäß eine höhere Expression an HIPK2 als U2OS-Zellen, so dass die Vermutung bestand, durch Verwendung dieser Zelllinie ein stärkeres fluoreszierendes Signal der endogenen HIPK2 zu erlangen. Dieser gewünschte Effekt blieb jedoch aus, obwohl die verwendete Fixierung mit PFA und Triton ansonsten durchweg gute Fixierungsergebnisse gezeigt hat. Der früher von Hofmann et al. erfolgreich zur Darstellung der endogenen HIPK2 verwendete Primärantikörper [32], zeigte in dieser Arbeit keine spezifische Färbung nuklearer Speckles. Stattdessen wurden die besten Ergebnisse mit den in Meerschweinchen generierten Primärantikörpern  $\Delta C$  K 121 und  $\Delta C$  K 442 erzielt. Somit lässt sich sagen, dass die beschriebene Fixierungsmethode und die dazu verwendeten Antikörper zwar ein fluoreszierendes Signal im Kern einzelner Zellen hervorgerufen haben, jedoch war dieses nicht in allen Zellen auszumachen. Zudem war das Signal so schwach, dass keine eindeutige Analyse der endogenen HIPK2 erfolgen konnte. Somit konnte die Analyse der zellzyklus-abhängigen HIPK2-Verteilung nicht mit der endogenen HIPK2 durchgeführt werden und es wurden stattdessen exprimierte und Epitop-markierte HIPK2-Konstrukte verwendet.

## **4.2 Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 nach Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife**

Seit der Entdeckung der Serin / Threonin-Kinase HIPK2 1998 ist ihre Eigenschaft bekannt, sich im Kern zu Speckles zu akkumulieren [14]. Bereits einige Jahre später wurde gezeigt, dass eine inaktive Punktmutante dieser Kinase keine Speckles ausbildet [15]. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Lokalisation von HIPK2 innerhalb der Zelle mit der Aktivität dieser Kinase korreliert. Die genauen Mechanismen zur Regulierung der Aktivität von HIPK2 sind bislang nur unzureichend geklärt. HIPK2 gehört zu der Proteinkinase-Familie der DYRK-Kinasen [24]. Die Aktivierungsschleife der DYRKs enthält ein kritisches Tyrosin, das autophosphoryliert werden muss um diese Kinasen zu aktivieren [17] (1.2.4.4). Auch HIPK2 enthält eine Aktivierungsschleife, jedoch sind die für die HIPK2-Aktivität wichtigen Aminosäuren nicht bekannt. Somit mussten die potentiellen Phosphorylierungsstellen der Aktivierungsschleife identifiziert werden um dann ihren jeweiligen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 zu testen.

### **4.2.1 Die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen HIPK2-Konstrukte**

Die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin sind phosphorylierbar, da sie eine Hydroxylgruppe besitzen. Innerhalb der Aktivierungsschleife von HIPK2 kommen mehrere dieser Aminosäuren vor. In verschiedenen Datenbanken ist das Threonin an Position 353 als phosphoryliert gelistet. Zusätzlich hat L. de la Vega das Serin an Position 357 als Phosphorylierungsstelle identifiziert. Unveröffentlichte Daten von V. V. Saul haben gezeigt, dass ebenfalls die Tyrosine an Position 354, 359 und 360 phosphoryliert sind. Besonders stark wird dabei das Tyrosin 354 phosphoryliert. Aufgrund des bekannten Einflusses der Kinaseaktivität auf die intrazelluläre HIPK2-Lokalisation wurden verschiedene HIPK2-Mutanten bezüglich ihrer Lokalisation untersucht, auch um damit Hinweise auf ihre relative Kinaseaktivität zu erhalten.

#### **4.2.1.1 Der Einfluss der Tyrosin-Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von HIPK2 auf die intrazelluläre Lokalisation der Kinase**

Die Abbildung 3.2(a-f) zeigt die mikroskopische Darstellung mittels Immunfluoreszenz. Hieraus und aus den darauffolgenden Diagrammen (Abb. 3.4 und 3.5) ist ersichtlich, dass der Phänotyp 1 beim Wildtyp einen Anteil von 90 % an der Gesamtverteilung ausmacht. Bei der inaktiven Punktmutante K221A zeigen sich hingegen 84 % der Zellen als Phänotyp 3. Der Einfluss

der verschiedenen Tyrosin-Mutationen ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Durch die Mutation des oben erwähnten Tyrosins 354 zu Phenylalanin (F) zeigt sich eine leichte Verschiebung in der Verteilung der Phänotypen. Phenylalanin wurde gewählt, da es in seiner Struktur dem Tyrosin am ähnlichsten ist. 78 % der Zellen zeigen sich hier als Phänotyp 1 und 21 % als Phänotyp 2. Durch diese Daten ist ersichtlich, dass das Tyrosin 354 alleine nur einen geringen Einfluss auf die Lokalisation von HIPK2 hat und dass trotz seiner Mutation weiterhin eine Speckle-Bildung erfolgt. Der einzige Unterschied zu der Wildtyp-Verteilung liegt darin, dass die Anzahl der Zellen zugenommen hat, die zusätzlich zum Kern auch Speckles im Zytoplasma aufweisen. Geht man davon aus, dass die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 seinen Aktivitätsstatus reflektiert, zeigen diese Daten also, dass Tyrosin 354 keinen großen Einfluss auf die HIPK2-Aktivität hat.

Auch die kombinierten Mutationen der Tyrosine 354 und 359 oder 354 und 360 zu Phenylalanin zeigen keine ausschlaggebende Veränderung in der Lokalisation. Erst bei der Kombination der Mutationen an Y359 und Y360 erscheinen 19 % der Zellen als Phänotyp 3. Das HIPK2-Konstrukt Y359/360F zeigt also eine Verschiebung in Richtung der Verteilung der inaktiven Punktmutante, weist zudem aber immer noch zu 54 % Phänotyp 1 und zu 12 % Phänotyp 2 auf. Auch hier zeigt sich also keine vollständige Unterbindung der Speckle-Bildung aber eine merkliche Zunahme der Zellen, in denen HIPK2 keine Speckles ausbildet.

Bei der Mutation aller drei Tyrosine der Aktivierungsschleife zu Phenylalanin, erscheinen wieder mehr Zellen als Phänotyp 1 (56 %) und Phänotyp 2 (40 %). Der Anteil der Phänotyp 3-ausbildenden Zellen ist hier verschwindend gering. Somit zeigt diese Mutation aller drei Tyrosine eine Verschiebung der Gesamtverteilung hin zum Phänotyp 2.

Bei einem anderen Konstrukt wurden die drei Tyrosine zu Glutamat (E) mutiert. Durch Glutamat entsteht eine phosphomimetische Mutante, bei der das entstehende Protein stets wirkt, als sei es phosphoryliert. Aus dem Diagramm ist zu erkennen, dass diese Mutante in ihrer Verteilung dem Wildtyp wesentlich ähnlicher ist, als die 3Y/F-Mutante. Somit zeigt die Phosphomimetik durch Glutamat seine Wirkung darin, dass wieder 76 % der Zellen dem Phänotyp 1 entsprechen. Hieraus lässt sich schließen, dass die Speckle-Bildung und deren alleiniges Vorkommen im Kern mit der Phosphorylierung des Proteins an den drei besagten Mutationsstellen zusammenhängen.

Bei einer weiteren Mutante wurden die drei Tyrosine zu Threonin (T) mutiert, da Threonin ebenfalls phosphorylierbar ist. Dieses Konstrukt zeigt eine signifikante Veränderung gegenüber dem Wildtyp, indem 51 % der Zellen sich als Phänotyp 2 darstellen und 44 % als Phänotyp 1. Damit sehen wir bei dieser Mutante den geringsten Anteil des Phänotyps 1 an der Gesamtverteilung und damit die bis jetzt stärkste Veränderung verglichen zum Wildtyp.

Das Diagramm in der Abbildung 3.4 zeigt die verschiedenen Tyrosin-Konstrukte im direkten Vergleich zueinander. Es ist gut erkennbar, wie die Verteilung der Phänotypen sich bei den einzelnen Mutanten verhält. Sehr anschaulich zeigt sich, wie stark sich zum Teil einzelne Mutationen im Vergleich zu multiplen Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 auswirken. So zeigt sich die Mutante Y359/360F als die mit dem breitesten Spektrum, bezogen auf die Phänotypen. Der Anteil des Phänotyps 3 beträgt hier 19 %. Bei den Mutationen aller drei Tyrosine hingegen weist keine der drei Mutanten einen so hohen Anteil des Phänotyps 3 auf. Somit ist es möglich, dass einige der Tyrosine aktivierend auf die Speckle-Bildung einwirken, während eins oder mehrere eher einen hemmenden Einfluss ausüben. Bei den Mutanten, bei denen das Tyrosin 354 mutiert ist, zeigen sich stets die beiden Speckle-ausbildenden Phänotypen dominant, während die anderen Phänotypen gemeinsam nicht über 9 % ausmachen. Bei der Mutante Y359/360F hingegen zeigen sich bereits 34 % der Zellen als nicht-Speckle-bildend. Also hat sich das Tyrosin 354 zwar als stark phosphoryliert hervorgetan, ist aber unter Umständen nicht ausschlaggebend für die Speckle-Bildung, sondern könnte auch einen hemmenden Einfluss auf diese ausüben, während die Tyrosine 359 und 360 die Speckle-Bildung positiv beeinflussen. Sind diese nämlich mutiert, kommt es zu einer stark verminderten Anzahl an Zellen mit Speckles. Eine weitere Beobachtung zeigt, dass bei vielen der Mutanten das Vorkommen von Speckles im Zytoplasma zugenommen hat. Am stärksten stechen die Mutanten 3Y/F und vor allem 3Y/T hervor. Bei letzterer bildet der Phänotyp 2 mit 51 % die Mehrheit. Also muss mindestens ein Tyrosin an der Rekrutierung der Speckles in den Kern beteiligt sein, da bei der Mutation dieses betroffenen Tyrosins die alleinige Lokalisation im Kern stark beeinflusst wird und bei über der Hälfte der Zellen ausbleibt. Bei der Mutante 3Y/E zeigt sich dagegen kein wesentlicher Verlust der Speckle-Bildung und vor allem auch kein Verlust der Lokalisation im Nukleus. Zwar sind leicht erhöhte Werte der Phänotypen 2 bis 4 zu verzeichnen, jedoch sind diese Änderungen so gering, dass man bei dieser Mutante fast von einer identischen Verteilung wie beim Wildtyp sprechen kann. Diese Daten zeigen also, dass die Lokalisation von HIPK2 zu Speckles im Nukleus auf gewisse Weise von der Phosphorylierung des Proteins abhängig ist. Es ist außerdem hervorzuheben, dass im Gegensatz zu den DYRK-Kinasen die phosphorylierbaren Tyrosine in der Aktivierungsschleife von HIPK2 nicht essentiell für die Lokalisation in Speckles und damit wahrscheinlich auch nicht wichtig für die Aktivität der Kinase sind. Daher ist zu vermuten, dass auch weitere phosphorylierbare Aminosäuren die Aktivität der HIPK2 steuern können.

#### 4.2.1.2 Der Einfluss der Threonin- und Serin-Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von HIPK2 auf die intrazelluläre Lokalisation der Kinase

Der Einfluss der Threonin- und Serin-Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 sind in der Abbildung 3.5 dargestellt. Bei der Mutation des Threonins an Position 353 zu Alanin (A) zeigten sich 16 % der Zellen als Phänotyp 3, so dass eine Minderung der Aktivität durch diese Mutation zu vermuten ist. Der Anteil des Phänotyps 3 ist also vergleichbar hoch wie bei der Mutante Y359/360F. Also scheint auch das Threonin 353 einen positiven Einfluss auf die Speckle-Bildung auszuüben. Allerdings beträgt der Anteil des Phänotyps 1 bei diesem Konstrukt noch 69%, worin zwar eine Veränderung gegenüber dem Wildtyp erkennbar ist, aber auf keine komplette Inaktivierung der Kinasefunktion geschlossen werden kann.

Bei der Kombination der Mutante T353 mit der Mutation am Tyrosin 354 ergab sich eine geringere Abweichung vom Wildtyp. Die Mutante T353A/Y354F wies zu 73 % den Phänotyp 1 und zu 19 % den Phänotyp 2 auf. Die alleinige Mutation an T353 hat eine stärkere Abweichung zum Wildtyp hervorgerufen, als die kombinierte Mutation T353A/Y354F, so dass sich also wieder das bereits weiter oben beschriebene Phänomen zeigt, dass ein Konstrukt, in dem das Tyrosin 354 mutiert ist, eine eindeutige Mehrheit der Speckle-bildenden Phänotypen (1 und 2) zur Folge hat. Also scheint Y354 die Speckle-Bildung nicht positiv zu beeinflussen, denn sonst müssten bei einer Mutation dieses Tyrosins weniger Zellen mit Speckles erscheinen. Dies ist nicht der Fall.

Als nächstes wurde die HIPK2-Mutante S357A auf ihre Phänotypen untersucht. Es zeigten sich auch hier 69 % der Zellen als Phänotyp 1 und 25 % als Phänotyp 2. Somit scheint auch das Serin an Position 357 alleine keinen großen Einfluss auf die Speckle-Bildung auszuüben. In der Kombination von Y354F und S357A ergibt sich eine eindeutige Veränderung in der Verteilung, indem bei dieser Mutante 97 % der Zellen als Phänotyp 2 auftreten. Die oben beschriebene Eigenschaft, die eine Mutation des Tyrosins 354 hervorruft, zeigt sich auch hier wieder. Die Speckle-Bildung ist durch die Mutation dieses Tyrosins in keiner Weise beeinflusst, jedoch wird die ausschließlich nukleäre Lokalisation der Speckles hierdurch unterbunden. Es zeigt sich bei dieser Mutante zum ersten Mal eine fast völlige Abwesenheit des Phänotyps 1. Die gemeinsame Mutation des Tyrosins 354 und des Serins 357 unterbindet also die vollständige Rekrutierung von HIPK2 in den Nukleus, behindert jedoch nicht die Speckle-Bildung, so dass fast alle Zellen Speckles im Kern und Zytoplasma zeigen. Es ist nicht möglich, hieraus die Aktivität des HIPK2-Konstrukts abzuschätzen, da der Phänotyp 2 weder typisch für den aktiven Wildtyp, noch für die inaktive Punktmutante K221A ist. Somit kann nur die Aussage getroffen werden, dass die kombinierten Mutationen an Y354 und S357 eine grundlegende Veränderung der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 hervorrufen, ohne diese Daten jedoch im Bezug auf die Auswirkungen auf die vermutliche



Aktivität zu deuten.

Ähnlich verhält es sich mit der Kombination der Mutationen T353A und S357A. Hier erscheinen 90 % der Zellen als Phänotyp 2. Es lässt sich also festhalten, dass die hier gezeigten Kombinationen der Mutation an S357 mit einer Mutation einer anderen Aminosäure dazu führen, dass HIPK2 sich, zusätzlich zu den nukleären Speckles, auch zu solchen im Zytoplasma akkumuliert. Die alleinige Mutation des Serins 357 weist zwar auch ein verstärktes Auftreten des Phänotyps 2 auf, jedoch liegen trotzdem 69 % der Zellen als Phänotyp 1 vor. Also ist das Serin 357 nicht alleine für die Lokalisation der Speckles im Kern verantwortlich, sondern es scheinen weitere Aminosäuren, wie das Y354 und T353 zusätzlich nötig zu sein, um eine Akkumulation von HIPK2 ausschließlich im Kern zu erreichen.

Es erfolgte die Untersuchung der Mutante ST/A, bei der alle Serine und Threonine, die in der Aktivierungsschleife vorkommen, zu Alanin mutiert wurden. Hier entsprachen wieder 68 % der Zellen dem Phänotyp 1 und nur 32 % dem Phänotyp 2. Dieses Ergebnis ist konträr zu dem zuvor genannten, bei dem durch die Kombination der Mutationen von T353A und S357A eine eindeutige Verschiebung der Phänotypen aufgetreten ist. Dies zeigt, dass die erwartete Änderung der Lokalisation von HIPK2 nicht mit der Anzahl an Mutationen zunimmt. Ganz im Gegenteil zeigt sich, dass zum Teil wenige Mutationen an bestimmten Aminosäuren einen größeren Effekt auf die Speckle-Bildung und deren Lokalisation haben, als die Mutation vieler Aminosäuren auf einmal. In dem Konstrukt ST/A sind im Vergleich zur Mutante T353A/S357A zusätzlich die Serine an Position 342, 344, 347 und 352 mutiert worden. Eins oder mehrere dieser Serine könnten im nicht-mutierten Protein eine hemmende Wirkung auf die Speckle-Bildung haben, so dass jetzt durch deren Mutation wieder zu hundert Prozent eine Speckle-Bildung erfolgt ist. Es scheint also, anders als bei den DYRK-Kinasen, ein komplexes Spiel an Wirkung und Wechselwirkung der einzelnen Aminosäuren untereinander zu existieren, um die natürliche nukleäre Lokalisation von HIPK2 zu Speckles zu ermöglichen.

#### **4.2.1.3 Der Einfluss multipler Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von HIPK2 auf die intrazelluläre Lokalisation der Kinase**

Der Einfluss multipler Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Das HIPK2-Konstrukt 3Y/F+TS, bei dem alle drei Tyrosine, das Threonin an 353 und das Serin an 357 mutiert wurden, zeigt eine starke Verschiebung der Verteilung hin zum Phänotyp 2. Dieser erscheint hier zu 74 %, während nur 20 % der Zellen als Phänotyp 1 auftreten. Das Konstrukt T353A/S357A zeigt eine ähnliche, aber noch stärker vom

Wildtyp abweichende Verteilung. Die Kombination der Mutationen T353A und S357A weist also bis jetzt die stärkste Veränderung der intrazellulären Lokalisation auf, während zusätzliche Mutationen der restlichen Serine oder der drei Tyrosine diesen Effekt wieder vermindern.

Als letztes erfolgte die Analyse einer Mutante, bei der alle Serine, Threonine und Tyrosine innerhalb der Aktivierungsschleife mutiert wurden. Bei dem HIPK2-Konstrukt allSTY zeigen 81% der Zellen sich als Phänotyp 3 und 13 % als Phänotyp 4. Die intrazelluläre Lokalisation verhält sich also sehr ähnlich zu der der inaktiven Punktmutante und zeigt sogar einige Zellen, die noch stärker vom Erscheinungsbild des Wildtyps abweichen. Der Phänotyp 4 bildet weder Speckles, noch beschränkt sich die Lokalisation von HIPK2 auf den Kern. Somit stellt HIPK2-allSTY eine noch stärkere Abwandlung zum Wildtyp dar als die inaktive Punktmutante. Diese extreme Veränderung kann zwei Gründe haben. Die erste Möglichkeit ist, dass alle potentiellen Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aktivierungsschleife gemeinsam agieren, um die normale nukleäre Lokalisation von HIPK2 in Speckles hervorzurufen. Somit würde die Mutation einzelner dieser Stellen nur einen geringen Einfluss auf die Lokalisation ausüben und erst die Mutation aller zeigt eine Wirkung, ähnlich wie bei der inaktiven Punktmutante. Die zweite Möglichkeit ist, dass die große Zahl an Mutationen wie bei dem Konstrukt allSTY zu extreme Veränderungen im Protein ausgelöst hat. Die hohe Anzahl an Mutationen könnte dafür sorgen, dass HIPK2 sich nicht mehr richtig bilden kann und die Änderung der Lokalisation nicht alleine auf seine Inaktivierung zurückzuführen ist, sondern darauf, dass die Struktur der Aktivierungsschleife gestört wurde, so dass sie nicht mehr richtig gebildet wird.

Abschließend lässt sich sagen, dass anhand der hier durchgeführten Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von HIPK2 eine Reihe von Veränderungen, bezogen auf ihre intrazelluläre Lokalisation, aufgetreten ist. Jede Mutation hat die Lokalisation von HIPK2 spezifisch beeinflusst. Jedoch waren die Veränderungen bei keiner der mutierten Aminosäuren so ausschlaggebend, dass sich eine einzelne Aminosäure als kritischer Regulator der intrazellulären Lokalisation hervorgetan hätte. Vielmehr hat sich gezeigt, dass bei bestimmten Mutationen, wie zum Beispiel bei dem Konstrukt Y354F/S357A, die Speckle-Bildung in keiner Weise beeinflusst wird, jedoch die alleinige Lokalisation der Speckles im Nukleus entfällt. Also scheinen die verschiedenen Merkmale der natürlichen Wildtyp-Verteilung auf verschiedenen Aminosäuren festgelegt zu sein, so dass sich bei der Mutation einer solchen nicht gleich die gesamte Verteilung ändert. Die charakteristische Wildtyp-Verteilung ergibt sich also erst durch das Zusammenspiel vieler einzelner Aminosäuren. Inwieweit nun anhand der Lokalisation von HIPK2 eine Aussage über ihre Aktivität möglich ist bleibt vorerst offen. Hierzu sollte mehr über die eigentliche Kinaseaktivität der genannten Mutanten in Erfahrung gebracht werden, um ein Gesamtbild über die

Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der Aktivierungsschleife zu erlangen und so den Zusammenhang zwischen Lokalisation und Aktivität von HIPK2 abschließend zu klären. Es ist auch möglich, dass einzelne Aminosäuren in der Aktivierungsschleife die Substratspezifität der HIPK2 regulieren, was in zukünftigen Experimenten zu überprüfen wäre.

#### **4.2.1.4 Die Größe, Form und Verteilung der Speckles stellt kein charakteristisches Merkmal für die einzelnen Mutanten dar**

Zusätzlich zu der intrazellulären Lokalisation der HIPK2-Konstrukte wurden die ausgebildeten Speckles genauer betrachtet. Es traten immer wieder Zellen auf, deren Speckles eine markante Anordnung hatten. Des Weiteren gab es Zellen mit auffallend großen oder kleinen Speckles, sowie besonders runde oder ovale Exemplare. Durch diese unterschiedlichen Formen ergab sich die Frage, ob die verschiedenen HIPK2-Konstrukte Speckles ausbilden, die für sie charakteristisch sind. Hierzu erfolgte eine Analyse der Speckles der einzelnen Mutanten. Es ergab sich, dass untypisch angeordnete und geformte Speckles für alle Mutanten zu beobachten waren, sodass dieses Phänomen unabhängig von einzelnen Aminosäuren in der Aktivierungsschleife ist und somit kein charakteristisches Kriterium für einzelne Mutanten darstellt.

### **4.3 Die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 in Abhängigkeit vom Zellzyklus**

Während des Zellzyklus durchläuft eine eukaryontische Zelle weitreichende Veränderungen. HIPK2 hat großen Einfluss auf den Verlauf des Zellzyklus und kann bei auftretenden DNA-Schäden dessen Arrest veranlassen oder bei irreparablen Schäden sogar die Apoptose der Zelle einleiten [32, 56]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden unter anderem dadurch inspiriert, dass das Threonin an Position 353 in der Datenbank *Phosida* ([www.phosida.com](http://www.phosida.com)) als Zellzyklus-reguliert beschrieben ist. Um dies zu untersuchen und möglicherweise weitere Phosphorylierungsstellen zu finden, die Zellzyklus-reguliert sein könnten, wurden verschiedene HIPK2-Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert, welche dann synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Synchronisation fixiert wurden (3.3.3). Der Zeitpunkt 0 h markiert den Eintritt in die S-Phase. Das Hauptaugenmerk liegt auf der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 und wie diese sich über den Verlauf des Zellzyklus verändert. Bei den getesteten HIPK2-Mutanten ist von Interesse, ob sie sich ähnlich wie der Wildtyp verhalten, oder ob die Mutation einzelner Aminosäuren innerhalb der Aktivierungsschleife eine drastische Verschiebung in der Lokalisation auslöst. Die Regulation der intrazellulären Lokalisation von

verschiedenen Proteinen durch den Zellzyklus ist bereits seit einigen Jahrzehnten bekannt. So veröffentlichten Milarski et al. 1986 Daten zur Zellzyklusregulation des Proteins HSP70 (*major heat shock and stress-induced protein*), welches in menschlichen Zellen einem komplexen Regulationsmechanismus unterliegt. Die synchronisierten HeLa-Zellen wiesen einen starken Anstieg der HSP70-Expression zu Beginn der S-Phase auf und eine darauffolgende starke Verminderung der HSP70-Menge in der späten S- und frühen G2-Phase. Gleichzeitig erkannten Milarski et al., dass sich die intrazelluläre Lokalisation von HSP70 über den Verlauf des Zellzyklus ändert. So zeigt sich während der G1- und G2-Phase eine diffuse Verteilung des Proteins im Kern und Zytoplasma, während es in der S-Phase ausschließlich im Kern vorzufinden ist [98].

Wie in der Abbildung 3.11 zu sehen ist, weist der HIPK2-Wildtyp ebenfalls eine Schwankung in der Verteilung der verschiedenen Phänotypen über den betrachteten Zeitraum auf. Der Anteil des Phänotyps 1 an der Gesamtverteilung verringert sich vom Zeitpunkt 0 h bis zum Zeitpunkt 8 h um 24 %. Also stellen sich beim Eintritt in die S-Phase 94 % der Zellen als Phänotyp 1 dar, während es in der G2-Phase nur noch 70 % sind. Gegensätzlich verhält sich der Phänotyp 3, dessen Anteil im gleichen Zeitraum um 22 %, von 4 % auf 26 %, ansteigt. Es ist also eine klare Veränderung zu sehen, die durch den Einfluss des Zellzyklus auf die Zelle und HIPK2 entsteht.

Der Anteil des Phänotyps 1 sinkt vom Beginn der S-Phase bis hin zur G2-Phase, während der Anteil des Phänotyps 3 in dieser Zeitspanne ansteigt. Ein Grund dafür könnte die Interaktion HIPK2s mit p53 sein. P53 wird sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase als Antwort auf DNA-Schäden aktiv und sorgt für den Arrest des Zellzyklus [99]. Da HIPK2 p53 aktiviert, indem sie es am Serin 46 phosphoryliert [32], muss die Kinase also zu diesen Zeitpunkten während des Zellzyklus in erhöhtem Maße bereit sein zu agieren. Inwieweit HIPK2 zu den gemessenen Zeitpunkten aktiv ist, geht aus diesem Experiment nicht hervor. Bisher ist unbekannt, wie sich die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 darstellt, wenn die Kinase mit p53 interagiert und dieses phosphoryliert. Somit kann hier nur die Aussage getroffen werden, dass eine Umverteilung der Lokalisation von HIPK2 während des Zellzyklus auftritt, die wahrscheinlich funktionelle Gründe hat. Ob diese Umverteilung mit einer erhöhten Bereitschaft korreliert p53 zu phosphorylieren, bleibt offen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass HIPK2 mit anderen Proteinen interagiert, die für die Zellzyklusregulation verantwortlich sind, wie den Cdks. Bekannt ist eine solche Interaktion zum Beispiel für Sp1. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors unterliegt einer Regulation durch verschiedene Zellzyklusregulatoren wie Cdk4 und SKP2 [100]. Um zu analysieren, ob eine solche Interaktion auch zwischen HIPK2 und weiteren zellzyklusregulierenden Proteinen besteht, müssen weitere Untersuchungen folgen. Hierzu könnte HIPK2 gemeinsam mit verschiedenen Zellzyklusregulatoren in Zellen transfiziert werden, um dann die

daraus resultierende Auswirkung auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 in den entsprechenden Zellzyklusphasen zu erfassen.

Nach dem HIPK2-Wildtyp erfolgte die Analyse der Zellzyklusauswirkungen auf das Konstrukt Y354F. Wie oben bereits erwähnt ist das Tyrosin 354 stark und konstitutiv phosphoryliert. Das zur Veranschaulichung der Daten erstellte Diagramm in Abbildung 3.12 zeigt auch bei diesem HIPK2-Konstrukt eine eindeutige Veränderung der Phänotypverteilung im Verlauf des Zellzyklus. Die Häufigkeit des Phänotyps 1 sinkt vom Zeitpunkt 0 h bis zum Zeitpunkt 8 h um 20 % ab, während sich der Phänotyp 2 gegensätzlich verhält und sein Anteil im gleichen Zeitraum um 20 % zunimmt. Zum Zeitpunkt 10 h ist die Verteilung jedoch fast wieder identisch mit der zum Zeitpunkt 0 h. Da nur Daten für die ersten 10 Stunden nach dem Eintritt in die S-Phase erhoben wurden, wäre es interessant zu wissen, inwieweit sich die Lokalisation noch zu späteren Zeitpunkten ändern kann. Wie bereits unter 4.2.2 erläutert, ruft die Mutation des Tyrosins 354 eine Verschiebung der intrazellulären HIPK2-Lokalisation hervor. Betrachtet man die Zellzyklusdaten des Konstrukts Y354F im Vergleich zum Wildtyp, ist eine vergleichbare Entwicklung zu erkennen, nämlich dass der Phänotyp 1 zum Zeitpunkt 0 h sein Maximum hat und nach 8 h seinen Minimalwert erreicht. Beim Wildtyp verhält sich der Phänotyp 3 dazu gegensätzlich und beim Konstrukt Y354F der Phänotyp 2. Durch die Mutation des Tyrosins 354 kann keine Phosphorylierung an dieser Aminosäure erfolgen und trotzdem zeigen sich zellzyklusabhängige Schwankungen in der Lokalisation. Geht man davon aus, dass die Phosphorylierung der Kinase ihre Lokalisation bestimmt, müssen anderweitige Phosphorylierungsstellen existieren, deren Phosphorylierungsgrad sich während des Zellzyklus verändert, so dass die gezeigten Lokalisationsänderungen bei HIPK2-Y354F zustande kommen können. Mit dieser Versuchsreihe lässt sich allerdings nur der Einfluss des Zellzyklus auf die Lokalisation untersuchen und man erhält keine Daten über den Grad der Phosphorylierung der Kinase zu den unterschiedlichen Messpunkten. In weiteren Experimenten sollte neben der Aktivität von HIPK2 auch der Phosphorylierungsgrad in den verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht werden. Geht man allerdings davon aus, dass die Umverteilung der intrazellulären HIPK2-Lokalisation nicht durch die Phosphorylierung verschiedener Aminosäuren innerhalb der Aktivierungsschleife hervorgerufen wird, so müssen andere Mechanismen zu Grunde liegen. Eine Option ist die bereits weiter oben besprochene Möglichkeit, dass die Lokalisation von HIPK2 durch Proteine beeinflusst wird, mit denen HIPK2 während des Zellzyklus interagiert. Außerdem ist es möglich, dass die posttranslationalen Modifikationen von HIPK2 sich während des Zellzyklus ändern und so die Änderung der Lokalisation hervorgerufen wird.

Die Mutante Y359/360F war in der vorangegangenen Versuchsreihe, bezogen auf ihre Verteilung der Phänotypen, besonders aufgefallen, da sie von allen Tyrosin-Mutanten das breiteste Spektrum an Phänotypen aufgewiesen und den höchsten Anteil des Phänotyps 3 mit 19 % gezeigt hat. Die Zellzyklus-Analyse dieser Mutante ergab die im Diagramm in Abbildung 3.13 gezeigte intrazelluläre Verteilung. Auch hier sieht man bis zum Zeitpunkt 8 h nach der Synchronisation einen entscheidenden Wandel. Der Phänotyp 1 nimmt bis zur G2-Phase hin um 15 % zu, während gleichzeitig der Phänotyp 3 um 14 % abnimmt. Also sehen wir bei diesem Konstrukt zwar auch die extremsten Werte für zwei Phänotypen zum Zeitpunkt 0 h und nach 8 h, jedoch mit der genau umgekehrten Entwicklung als beim Wildtyp. Während der Phänotyp 1 beim Wildtyp bis zum Zeitpunkt 8 h abnimmt, steigt er bei HIPK2-Y359/360F an. Das gleiche Bild zeigt sich für den Phänotyp 3, der in dieser Zeitspanne beim Wildtyp zunimmt und bei der Mutante Y359/360F absinkt.

Bei der Mutante 3Y/F, bei der alle drei Tyrosine durch Phenylalanin ersetzt wurden, zeigt sich eine etwas abweichende Entwicklung, als bei den bisher gezeigten Mutanten (Abb. 3.14). Hier sticht nicht der Zeitpunkt 8 h nach erfolgter Synchronisation hervor, sondern die stärkste Veränderung ist zum Zeitpunkt 3 h zu vermerken. Während über den gesamten restlichen Verlauf die Häufigkeit des Phänotyps 1 bei circa 60 % liegt, sinkt sie hier rapide auf 33 % ab. Gegenläufig verhält sich hier der Phänotyp 2, welcher konstant bei circa 37 % liegt, aber zum Zeitpunkt 3 h auf einen Anteil von 63 % ansteigt. 3 h nach der Synchronisation befindet sich die Zelle mitten in der S-Phase, die durch eine hohe Proteinsynthese gekennzeichnet ist. Ob diese Tatsache die Änderung der Verteilung hervorruft, oder ob andere Mechanismen hier eine entscheidende Rolle spielen, kann mit denen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht beantwortet werden.

Festhalten lässt sich, dass der Wildtyp und die Mutanten Y354F und Y359/360F zum Zeitpunkt 3 h keine großen Veränderungen zeigen, dafür aber kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 8 h ein Anstieg bzw. Absinken einzelner Phänotyphäufigkeiten zu sehen ist. Die Ergebnisse, die sich bei dem Konstrukt 3Y/F zeigen, passen nicht in dieses bisher erfasste Schema. Also scheinen die Tyrosine der Aktivierungsschleife kollektiv zu den Veränderungen im Zellzyklus beizutragen, die sich für den Wildtyp gezeigt haben. Ob sie durch ihren Phosphorylierungsgrad, die Interaktion mit anderen Proteinen oder einen anderen, hier nicht betrachteten Mechanismus zu dieser Veränderung beitragen, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die letzte analysierte Mutante ist HIPK2-T353A (Abb. 3.15). Wie bereits erwähnt, wird das Threonin an Position 353 als Zellzyklus-reguliert beschrieben ([www.phosida.com](http://www.phosida.com)). Bei der Analyse zeigt sich, dass auch hier der Anteil des Phänotyps 3 vom Zeitpunkt 0 h bis 8 h ansteigt, von 7 % auf 20 %. Dieser Anstieg gestaltet sich aber nicht so kontinuierlich und fließend wie bei

einigen zuvor betrachteten Mutanten. Der Anteil des Phänotyps 1 fällt im gleichen Zeitraum um 14 % ab. Somit zeigt sich für das Konstrukt HIPK2-T353A eine ähnliche Veränderung in der Lokalisation, wie sie bereits bei den meisten der zuvor besprochenen Konstrukten beobachtet wurde. Die Aussage, dass alleine das Threonin 353 Zellzyklus-reguliert ist, kann also nicht getroffen werden, sonst hätten sich die Daten hier von den anderen Konstrukten unterscheiden müssen. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass mit diesem Experiment keine Daten darüber erfasst werden, ob sich der Phosphorylierungsgrad des Threonins 353 im Laufe des Zellzyklus verändert, oder ob es auf andere Art und Weise vom Zellzyklus beeinflusst wird. Festzuhalten ist, dass die Lokalisationsänderung von HIPK2, trotz der Mutation dieser Aminosäure, ähnlich wie beim Wildtyp ist. Somit kann es sein, dass T353 in bestimmter Weise Zellzyklus-reguliert ist, dies aber keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 hat. Wie bei den anderen Mutanten ist die Ursache für diese Änderung der intrazellulären Verteilung noch ungeklärt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die veränderte Lokalisation während des Zellzyklus wichtig für die Regulation desselbigen ist. Bekannt ist, dass HIPK2 sowohl als Regulator für die Genexpression fungiert, als auch für die Phosphorylierung und Regulation der Transkriptionsfaktoren p53 und IPF1/PDX (*insulin promoter factor-1/pancreatic duodenal homeobox-1*) verantwortlich ist [32, 56, 101]. Hier stellt sich die Frage, ob sich durch die Änderung der HIPK2-Lokalisation auch die Fähigkeit der Kinase verändert, diese Aufgaben zu erfüllen und den Zellzyklus zu beeinflussen.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei allen getesteten HIPK2-Konstrukten eine Veränderung in der intrazellulären Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus zu beobachten war. Abgesehen von der Mutante 3Y/F, waren bei allen Mutanten die Zeitpunkte 0 h und 8 h die mit den gegensätzlich extremsten Verteilungen der Phänotypen. In weiteren Studien sollte überprüft werden, inwieweit die Phosphorylierung und die Aktivität von HIPK2 im Laufe des Zellzyklus schwanken. Von großem Interesse ist auch, ob sich die posttranslationale Modifikation von HIPK2 während des Zellzyklus verändert.

Zusätzlich sollten die Zellzyklus-regulierenden Proteine, die mit HIPK2 interagieren, identifiziert werden um ihre möglichen Auswirkungen auf die intrazelluläre Lokalisation der Kinase zu überprüfen. Die genauen Mechanismen die zur Versammlung von HIPK2 im Zellkern führen, sind bislang weitgehend unbekannt. Allerdings weiß man, dass HIPK2 zwei Abschnitte in seiner Aminosäuresequenz hat, bei deren Mutation die Rekrutierung in den Nukleus ausbleibt, und die daher als NLS (*nuclear localization signal*) bezeichnet werden. Diese befinden sich an Position 795 bis 798 (NLS1) und 825 bis 828 (NLS2) [unveröffentlichte Daten L. de la Vega, et al.]. Keines der in dieser Arbeit gezeigten HIPK2-Konstrukte weist eine Mutation in diesen beiden Regionen auf.

Trotzdem zeigen sich starke Lokalisationsänderungen, bei denen der Aufenthalt vieler HIPK2-Mutanten sich nicht ausschließlich auf den Kern beschränkt. Somit müssen neben den beiden identifizierten NLS noch weitere Aminosäuren einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 haben. Hat man die Ursachen für die Lokalisationsänderung identifiziert, sollte die daraus resultierende Funktion für die Zelle untersucht werden. Zum Beispiel wäre es interessant zu wissen, ob die veränderte Lokalisation innerhalb des Zellzyklus wichtig für die Fähigkeit von HIPK2 ist, den Zellzyklus zu regulieren. So ist die Interaktion mit p53 vielleicht nur dann möglich, wenn HIPK2 zu Speckles akkumuliert ist, oder es ist nötig, dass sich die Speckle-Formation auflöst, damit eine Interaktion mit p53 oder anderen Zellzyklus-regulierenden Proteinen stattfinden kann. Auch ist noch nicht bekannt, was für eine Funktion HIPK2 im Zytoplasma hat und inwieweit dort eine Akkumulation zu Speckles essentiell oder hinderlich für bestimmte Interaktionspartner ist.

All diese Aspekte sollten in Zukunft untersucht werden, um ein konkreteres Bild davon zu erhalten, wie wichtig HIPK2 für die intrazellulären Regulationsmechanismen ist. Der medizinische Nutzen aus diesen Erkenntnissen ist zu diesem Zeitpunkt nicht absehbar. Jedoch gibt es vielversprechende Hinweise, dass ein besseres Verständnis der Funktion und der Regulationsmechanismen der Serin-Threonin-Kinase HIPK2 einen großen Schritt in der Krebsforschung bedeuten könnte.



## 5 Zusammenfassung

Der erste Teil der Dissertation befasst sich mit der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der endogenen HIPK2. Diese Serin/Threonin-Kinase befindet sich überwiegend im Zellkern in Speckles. Der Vergleich unterschiedlicher Fixierungsmethoden zeigte, dass die besten Färbungen durch die Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd in Kombination mit 0,1 %igem beziehungsweise 0,3 %igem Triton X-100 erzielt wurden. Als geeignete Primärantikörper erwiesen sich  $\Delta$ C K 121 und  $\Delta$ C K 442 (1:1500 bis 1:4000) in Kombination mit dem Sekundärantikörper anti-Mehrschwein IgG Cy3 (1:1500). Obwohl eine Reihe von Zellen bei der Betrachtung Speckles im Kern aufwiesen, haben diese nur sehr schwach fluoresziert und waren nicht in allen Zellen nachweisbar. Es bedarf weiterer Anstrengungen um eine zuverlässige Darstellung zu erreichen, durch die die Arbeit mit der endogenen HIPK2 auch fluoreszenzmikroskopisch problemlos und reproduzierbar möglich ist.

Da die Lokalisation der HIPK2 in nuklearen Speckles von der Kinaseaktivität abhängt, wurden unterschiedliche HIPK2-Punktmutanten bezüglich ihrer intrazellulären Verteilung untersucht. Dazu wurden HIPK2-Varianten mit Mutationen in den phosphorylierbaren Aminosäuren der Aktivierungsschleife in Zellen exprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen auf die Lokalisation von HIPK2 waren sehr unterschiedlich. Eine einzelne Aminosäure, die als An- und Ausschalter für die Aktivität und somit die typische Speckle-Bildung fungiert, konnte hierbei nicht identifiziert werden. Vielmehr scheinen multiple Phosphorylierungen und ein komplexes Wechselspiel zwischen den einzelnen Aminosäuren die intrazelluläre Lokalisation von HIPK2 zu beeinflussen. Innerhalb dieses Zusammenspiels übernehmen vermutlich einige Aminosäuren aktivierenden und andere inaktivierenden Einfluss auf die Speckle-Bildung und die ausschließliche Lokalisation im Kern. In weiteren Arbeiten zu diesem Thema sollte der genaue Zusammenhang zwischen der Aktivität von HIPK2 und der Mutation einzelner Aminosäuren der Aktivierungsschleife erfasst werden. Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der intrazellulären Lokalisation von HIPK2 lag, lässt sich keine Aussage über die mögliche Aktivitätsänderung durch Mutationen treffen. Diese zusätzlichen Daten sind nötig um ein konkreteres Bild über die Bedeutung der Aktivierungsschleife und ihre einzelnen Aminosäuren zu erhalten.

Da HIPK2 den Zellzyklus regulieren kann, wurde die intrazelluläre Verteilung der Kinase in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Hierbei zeigte sich für den HIPK2-Wildtyp vom Beginn der S- bis in die G2-Phase hinein eine Abnahme der Zellen, die ausschließlich Speckles im Kern bilden, um 24 %. Gleichzeitig stieg in diesem

Zeitraum der Anteil der Zellen, die eine diffuse Verteilung von HIPK2 im Kern aufweisen, um 22 % an. Untersuchungen zur Zellzyklusregulation der intrazellulären Verteilung von HIPK2-Varianten mit Punktmutationen in der Aktivierungsschleife wiesen keine Unterschiede zur Verteilung im Vergleich zur Wildtyp-Kinase auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellzyklus-regulierte Verteilung der HIPK2 nicht durch Phosphorylierungsereignisse innerhalb der Aktivierungsschleife reguliert wird, sondern durch andere Mechanismen die in zukünftigen Studien untersucht werden können.

## 6 Summary

The first part of this thesis gives attention to the exposition of the endogenous HIPK2 via fluorescence microscopy. This serine/threonine kinase is mainly found within the nucleus, accumulated to speckles. The comparison of different fixation methods showed that the best staining was achieved by fixing the cells with 4 % paraformaldehyde combined with 0,1 % or 0,3 % Triton X-100. The most capable primary antibodies were  $\Delta$ C K 121 and  $\Delta$ C K 442 (1:1500 to 1:4000) in combination with the secondary antibody anti-guinea pig IgG Cy3 (1:1500). Even if a set of cells showed speckles within the nucleus during the examination, the signal was weak and could not be detected in all cells. It should be the effort of further experiments to achieve a reliable exposition which makes the work with the endogenous HIPK2 in immunofluorescence unproblematic and reproducible.

Since the accumulation of HIPK2 to nuclear speckles is regulated by its kinase activity, the different HIPK2 point mutants were analyzed concerning their intracellular spreading. For this purpose HIPK2 variants with mutations of the amino acids within the activation loop that can be phosphorylated were expressed in cells and analyzed using immunofluorescence. The effects of the different mutations upon the intracellular localization of HIPK2 were very variable. A single amino acid which acts as a switch to turn the activity on or off and therefore has the control over the typical formation to speckles could not be identified. It rather seems as if multiple phosphorylations and a complex interplay between the different amino acids regulate the intracellular localization of HIPK2. Within this interplay some amino acids probably have influence in an activating way and some play an inactivating role by regulating the accumulation to speckles and the exclusive localization within the nucleus. In further projects concerning this topic, the exact interaction between the activity of HIPK2 and the mutations of different amino acids within the activation loop should be detected. Since this thesis has its focus on the intracellular localization of HIPK2, it gives no statement on the possible changes of kinase activity generated by mutations within the activation loop. These further data are essential to draw a more precise picture of the meaning and importance of the activation loop and its amino acids.

Since HIPK2 is able to regulate the cell cycle, the intracellular spreading of the kinase was investigated during the different phases of the cell cycle using immunofluorescence. For the HIPK2-wild type it showed from the entrance of the S-phase until the G2-phase a decrease of cells with exclusively nuclear speckles from about 24 %. During the same time, the proportion of cells with a diffuse spreading of HIPK2 within the nucleus increases about 22 %. Investigations about the cell cycle regulation of the intracellular localization of HIPK2-variants with point mutations within

the activation loop showed no differences concerning the intracellular spreading compared to the wild type kinase. These results show that the changes of the intracellular localization of HIPK2 during the cell cycle are not regulated by phosphorylation events within the activation loop, but have to be controlled by other mechanisms that should be explored in further studies.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Harris, H., *The Birth of the Cell*. Yale University Press, New Haven, 1999.
2. Dundr, M. and T. Misteli, *Functional architecture in the cell nucleus*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 2): p. 297-310.
3. Cremer, T. and C. Cremer, *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(4): p. 292-301.
4. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
5. Mohamad, N. and M. Boden, *The proteins of intra-nuclear bodies: a data-driven analysis of sequence, interaction and expression*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 44.
6. Pederson, T., *Half a century of "the nuclear matrix"*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 799-805.
7. Boisvert, F.M., et al., *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 574-85.
8. Zhong, S., P. Salomoni, and P.P. Pandolfi, *The transcriptional role of PML and the nuclear body*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. E85-90.
9. Misteli, T., *Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 11): p. 1841-9.
10. Gall, J.G., *Cajal bodies: the first 100 years*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 273-300.
11. Spector, D.L., *Macromolecular domains within the cell nucleus*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 265-315.
12. Misteli, T., *Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression*. Science, 2001. **291**(5505): p. 843-7.
13. Matera, A.G., *Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(8): p. 302-9.
14. Kim, Y.H., et al., *Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25875-9.
15. Möller, A., et al., *PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4310-4.
16. Handwerger, K.E. and J.G. Gall, *Subnuclear organelles: new insights into form and function*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(1): p. 19-26.
17. Lochhead, P.A., et al., *Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs*. Cell, 2005. **121**(6): p. 925-36.
18. Puca, R., et al., *HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 85.
19. Arai, S., et al., *Novel homeodomain-interacting protein kinase family member, HIPK4, phosphorylates human p53 at serine 9*. FEBS Lett, 2007. **581**(29): p. 5649-57.
20. Isono, K., et al., *Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2758-71.
21. Zhang, J., et al., *Essential function of HIPK2 in TGFbeta-dependent survival of midbrain dopamine neurons*. Nat Neurosci, 2007. **10**(1): p. 77-86.
22. Wei, G., et al., *HIPK2 represses beta-catenin-mediated transcription, epidermal stem cell expansion, and skin tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13040-5.
23. Trost, M., G. Kochs, and O. Haller, *Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7373-7.
24. Hofmann, T.G., et al., *Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34*. Biochimie, 2000. **82**(12): p. 1123-7.
25. Wang, Y., et al., *Isolation and characterization of cDNAs for the protein kinase HIPK2*.

- Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 168-72.
26. Schmitz, M.L., et al., *Nuclear compartmentation of HIPK2, a kinase with many talents.* Zellbiologie aktuell, 2005: p. 26-28.
  27. Kim, Y.H., C.Y. Choi, and Y. Kim, *Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12350-5.
  28. Gresko, E., et al., *Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(4): p. 1293-9.
  29. Choi, D.W., et al., *Ubiquitination and degradation of homeodomain-interacting protein kinase 2 by WD40 repeat/SOCS box protein WSB-1.* J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4682-9.
  30. Winter, M., et al., *Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(7): p. 812-24.
  31. Calzado, M.A., et al., *HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death.* Cell Cycle, 2007. **6**(2): p. 139-43.
  32. Hofmann, T.G., et al., *Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 1-10.
  33. Bracaglia, G., et al., *Methyl-CpG-binding protein 2 is phosphorylated by homeodomain-interacting protein kinase 2 and contributes to apoptosis.* EMBO Rep, 2009. **10**(12): p. 1327-33.
  34. Yamada, D., et al., *The human protein kinase HIPK2 phosphorylates and downregulates the methyl-binding transcription factor ZBTB4.* Oncogene, 2009. **28**(27): p. 2535-44.
  35. Hofmann, T.G., et al., *Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification.* J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29224-32.
  36. Kim, Y.H., et al., *Desumoylation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) through the cytoplasmic-nuclear shuttling of the SUMO-specific protease SENP1.* FEBS Lett, 2005. **579**(27): p. 6272-8.
  37. Sung, K.S., et al., *Differential interactions of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by phosphorylation-dependent sumoylation.* FEBS Lett, 2005. **579**(14): p. 3001-8.
  38. Engelhardt, O.G., et al., *The homeodomain-interacting kinase PKM (HIPK-2) modifies ND10 through both its kinase domain and a SUMO-1 interaction motif and alters the posttranslational modification of PML.* Exp Cell Res, 2003. **283**(1): p. 36-50.
  39. Rinaldo, C., et al., *MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis.* Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 739-50.
  40. Kim, S.Y., et al., *Stabilization of HIPK2 by escape from proteasomal degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase Siah1.* Cancer Lett, 2009. **279**(2): p. 177-84.
  41. Calzado, M.A., et al., *An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 85-91.
  42. Gresko, E., et al., *Autoregulatory control of the p53 response by caspase-mediated processing of HIPK2.* EMBO J, 2006. **25**(9): p. 1883-94.
  43. Rui, Y., et al., *Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation.* EMBO J, 2004. **23**: p. 4583-4594.
  44. Becker, W., et al., *Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25893-902.
  45. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh, *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation.* Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 661-75.
  46. Wolf, I., et al., *Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24490-7.
  47. Lochhead, P.A., *Protein kinase activation loop autophosphorylation in cis: overcoming a Catch-22 situation.* Sci Signal, 2009. **2**(54): p. pe4.

48. Cooper, J.A. and A. MacAuley, *Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(12): p. 4232-6.
49. Himpel, S., et al., *Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 3): p. 497-505.
50. Lochhead, P.A., et al., *dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in Drosophila*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 2): p. 381-91.
51. Missero, C., et al., *The DNA Glycosylase T:G Mismatch-specific Thymine DNA Glycosylase Represses Thyroid Transcription Factor-1-activated Transcription*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 33569-33575.
52. Choi, C.Y., et al., *The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone deacetylase complex to repress transcription*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33194-7.
53. Zhang, Q., et al., *Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP*. Cell, 2003. **115**(2): p. 177-86.
54. Wiggins, A.K., et al., *Interaction of Brn3a and HIPK2 mediates transcriptional repression of sensory neuron survival*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 257-67.
55. Pierantoni, G.M., et al., *High mobility group I (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth*. Oncogene, 2001. **20**(43): p. 6132-41.
56. D'Orazi, G., et al., *Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 11-9.
57. Dauth, I., J. Kruger, and T.G. Hofmann, *Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2274-9.
58. Kim, E.J., J.S. Park, and S.J. Um, *Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53-family in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 32020-32028.
59. Bernardi, R. and P.P. Pandolfi, *Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death*. Oncogene, 2003. **22**: p. 9048-9057.
60. Guo, A., et al., *The function of PML in p53-dependent apoptosis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 730-6.
61. Wang, Y., K.M. Debatin, and H. Hug, *HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels*. BMC Mol Biol, 2001. **2**: p. 8.
62. Di Stefano, V., et al., *HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function*. Oncogene, 2004. **23**: p. 5185-5192.
63. Pierantoni, G.M., et al., *High-mobility group A1 inhibits p53 by cytoplasmic relocation of its proapoptotic activator HIPK2*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 693-702.
64. Hofmann, T.G., et al., *HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8271-7.
65. Möller, A., et al., *Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression*. Oncogene, 2003. **22**: p. 8731-8737.
66. Ecsedy, J.A., J.S. Michaelson, and P. Leder, *Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 950-60.
67. Rochat-Steiner, V., et al., *FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation*. J Exp Med, 2000. **192**(8): p. 1165-74.
68. Rinaldo, C., et al., *HIPKs: Jack of all trades in basic nuclear activities*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(11): p. 2124-9.
69. Roscic, A., et al., *Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2*. Mol Cell, 2006. **24**(1): p. 77-89.
70. Hay, R.T., *SUMO: a history of modification*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 1-12.

71. Ulrich, H.D., *Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(10): p. 525-32.
72. Yoshida, H. and I. Kitabayashi, *Chromatin regulation by AML1 complex*. Int J Hematol, 2008. **87**(1): p. 19-24.
73. Aikawa, Y., et al., *Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation*. EMBO J, 2006. **25**(17): p. 3955-65.
74. Li, X.L., et al., *Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription*. Oncogene, 2007. **26**(51): p. 7231-9.
75. Schvartzman, J.B., L.M. Parras, and D.B. Krimer, *Replication and segregation of eukaryotic chromosomal DNA*. Revis Biol Celular, 1986. **10**: p. 1-130.
76. Novak, B., et al., *Model scenarios for evolution of the eukaryotic cell cycle*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. **353**(1378): p. 2063-76.
77. Green, B.M. and J.J. Li, *Loss of rereplication control in Saccharomyces cerevisiae results in extensive DNA damage*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 421-32.
78. Schäfer, K.A., *The cell cycle: a review*. Vet Pathol, 1998. **35**(6): p. 461-78.
79. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York, NY, 1983.
80. Kastan, M.B. and S.J. Kuerbitz, *Control of G1 arrest after DNA damage*. Environ Health Perspect, 1993. **101 Suppl 5**: p. 55-8.
81. Pines, J. and T. Hunter, *Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif?* Trends Cell Biol, 1991. **1**(5): p. 117-21.
82. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2077-86.
83. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1059-65.
84. Baldin, V., et al., *Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1*. Genes Dev, 1993. **7**(5): p. 812-21.
85. Dulic, V., E. Lees, and S.I. Reed, *Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase*. Science, 1992. **257**(5078): p. 1958-61.
86. Lees, E., et al., *Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner*. Genes Dev, 1992. **6**(10): p. 1874-85.
87. Tsai, L.H., E. Harlow, and M. Meyerson, *Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase*. Nature, 1991. **353**(6340): p. 174-7.
88. Yam, C.H., T.K. Fung, and R.Y. Poon, *Cyclin A in cell cycle control and cancer*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(8): p. 1317-26.
89. Jackman, M.R. and J.N. Pines, *Cyclins and the G2/M transition*. Cancer Surv, 1997. **29**: p. 47-73.
90. Takizawa, C.G. and D.O. Morgan, *Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(6): p. 658-65.
91. Hunt, T., *Cell biology. Cell cycle gets more cyclins*. Nature, 1991. **350**(6318): p. 462-3.
92. Sakaue-Sawano, A., et al., *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. Cell, 2008. **132**(3): p. 487-98.
93. Nishitani, H., Z. Lygerou, and T. Nishimoto, *Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30807-16.
94. Sacco-Bubulya, P. and D.L. Spector, *Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing*. J Cell Biol, 2002. **156**(3): p. 425-36.
95. Prasanth, S.G., et al., *Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2651-63.
96. Lee, S.J., et al., *Langerhans cell protein 1 (LCPI) binds to PNUTS in the nucleus: implications for this complex in transcriptional regulation*. Exp Mol Med, 2009. **41**(3): p. 189-200.



97. St-Germain, J.R., J. Chen, and Q. Li, *Involvement of PML nuclear bodies in CBP degradation through the ubiquitin-proteasome pathway*. Epigenetics, 2008. **3**(6): p. 342-9.
98. Milarski, K.L. and R.I. Morimoto, *Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(24): p. 9517-21.
99. Agarwal, M.L., et al., *p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8493-7.
100. Tapias, A., et al., *Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins*. Cell Cycle, 2008. **7**(18): p. 2856-67.
101. Boucher, M.J., M. Simoneau, and H. Edlund, *The homeodomain-interacting protein kinase 2 regulates insulin promoter factor-1/pancreatic duodenal homeobox-1 transcriptional activity*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 87-97.